

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Avances en el Estudio de Matrices Alimentarias
mediante RMN Metabolómica.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Castejón Ferrer

Directores

M^a Isabel Cambero Rodríguez
Antonio Herrera Fernández

Madrid, 2015



D. MARÍA ISABEL CAMBERO RODRÍGUEZ Profesora Titular del Departamento de Nutrición Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria y ANTONIO HERRERA FERNÁNDEZ, Catedrático del Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada “Avances en el Estudio de Matrices Alimentarias mediante RMN Metabolómica”, ha sido realizada bajo su dirección por David Castejón Ferrer en el *Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico* de la Universidad Complutense de Madrid. Asimismo, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente para optar al grado de Doctor.

Madrid, 9 de octubre de 2015

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: María Isabel Cambero Rodríguez

Fdo.: Antonio Herrera Fernández



El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido financiado mediante los proyectos de investigación AC2008-00011-00-00, CTQ2010-14936, AGL2007-65235 y AGL2010-19158 del Ministerio de Educación y Ciencia y del Grupo UCM-BSCH 920176GR35/10A.

AGRADECIMIENTOS

Hace años inicié un camino que no tenía un claro final, un camino que ya había intentado recorrer en otras ocasiones pero que por circunstancias de la vida se truncaba y tenía que volverse a recomponer. Por suerte, en ese camino se cruzaron los Profesores Isabel Cambero y Antonio Herrera que me han sabido guiar hasta aquí. Sólo puedo decir que ha sido un placer trabajar con vosotros todos estos años, pues habéis estado siempre ahí, enseñando, apoyando y dando ese empujoncito tan necesario cuando las fuerzas estaban llegando a su fin. Muchas gracias por vuestra dedicación, vuestra disposición y vuestro esfuerzo, pero sobre todo por haber confiado siempre en mí.

Quisiera agradecer también al Departamento de Química Analítica y en especial a mi tutora académica, la Profesora María Cruz Bondi, y a Mamen por haberme facilitado siempre las cosas. A mis compañeras Marién y Palmira que me han aguantado, enseñado, aconsejado y ayudado durante todos estos años. Al resto de mis compañeros del CAI de RMN y RSE, Lola, Elena y Ángel que siempre me han brindado su ayuda y colaboración cuando la he necesitado. A Marga y a Zulay siempre dispuestas a ayudar. A los *insaponificables*, Roberto y Juan, a las *brasileñas*, Roberta y Lucia y muy especialmente a Pascal, porque vuestro trabajo ha dado continuidad al mío y me ha servido para seguir adelante. A Rosa, a Karen, a Ana Belén, a Lola y al resto de componentes del departamento de NByTA que en mayor o menor medida me habéis ayudado durante todos estos años. A mis compañeros y excompañeros del IEB que siempre estáis ahí para que os suelte el rollo o simplemente para tener esos momentos de distracción tan necesarios. A la Profesora Marta Herraiz por su contribución, su apoyo y su positividad. Al Profesor Juan Manuel García Segura por su contribución y su esfuerzo. A la profesora Inmaculada Mateos por contar siempre conmigo y apoyarme incondicionalmente. Al laboratorio del Profesor López-Bote por su colaboración. A la Biblioteca de la Facultad de Químicas por su excepcional trabajo y en especial a Esther Escriche: que gran servicio prestáis. Por supuesto me gustaría agradecer a la Universidad Complutense por haberme brindado la posibilidad de desarrollarme profesionalmente durante todos estos años y crecer cada día un poco más. No quiero olvidar tampoco a las personas que me introdujeron y me guiaron durante mis primeros pasos en el sendero de

la ciencia, la Dra. Ana Gago y mis compañeros del laboratorio de la Universidad de Vigo, el Dr. Walter Vetter y el Dr. José Luis Lavandera, esta tesis también es vuestra.

A nivel personal muchas son las personas que han compartido conmigo la ilusión por sacar la Tesis Doctoral adelante, pero se lo quiero dedicar especialmente a mi madre porque siempre has sido un ejemplo a seguir, aún en las circunstancias más difíciles sigues apoyándonos e inculcándonos que sólo con esfuerzo y tesón se pueden alcanzar las metas que uno se proponga, por difíciles que sean; también a mi padre, por tu apoyo constante y por haber sabido escucharme y tranquilizarme en momentos difíciles; a mi hermano, familia y amigos, que siempre habéis estado pendientes aún cuando en muchas ocasiones no habéis recibido respuesta, se que estáis tan orgullosos de mi como yo lo estoy de vosotros. Pero esta tesis nunca hubiera podido ver la luz sin María, que fácil ha sido caminar contigo todos estos años, da igual que el camino sea llano o escarpado, que llueva o que haga frío, siempre estás ahí estirando la mano para ayudarme a seguir adelante, que orgulloso estoy de ti y de todo lo que construimos juntos. *Por suposto, teño que agradecerlles ós meus fillos, Elena e Roque, o ser como sodes, tan distintos e cercanos. Cada bico, cada aperta, cada sorriso foron os folgos precisos para poder dar un pasiño, e outro máis, e outro, ata alcanzar o que parece ser a fin dun camiño que seguramente sexá tamén o inicio dunha nova ruta por percorrer.*

Gracias!!!

- **NOTAS SOBRE PUNTUACIÓN**

Con el fin de simplificar la publicación de resultados en revistas internacionales que requieren la utilización del sistema científico de puntuación, se ha adoptado este sistema a lo largo de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de comas, lo que ha sido aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el *Diccionario Panhispánico de Dudas* desde su primera edición en octubre de 2005.

- **NOTAS SOBRE LAS REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

En la presente *Memoria*, las referencias bibliográficas se encuentran a pie de página. Ineludiblemente existen citas bibliográficas que se han repetido en diferentes páginas al tratar ciertos temas, pero se ha decidido mantener este criterio y facilitar en cada apartado la información bibliográfica completa. También se han incluido algunos comentarios y aclaraciones sobre aspectos y nomenclatura específicos de la Resonancia Magnética Nuclear, así como detalles acerca de la realización de experimentos. Las citas bibliográficas han sido introducidas de acuerdo a las normas bibliográficas de la *American Chemical Society* (ACS). Como anexo figuran todas las referencias citadas con sus títulos completos y ordenadas por orden alfabético de autor.

- **NOTAS SOBRE LOS TRABAJOS PUBLICADOS**

Los trabajos publicados se han considerado como unidades independientes y por tanto tienen su propia bibliografía y su propia lista de abreviaturas incluidas en el trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN /ABSTRACT	1
I. INTRODUCCIÓN	13
I.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN EL ANÁLISIS QUÍMICO DE ALIMENTOS.	15
I.2. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.	16
I.2.1. ANTECEDENTES. CONTEXTO HISTÓRICO.	16
I.2.2. PRINCIPIOS DE LA TÉCNICA.	20
I.2.3. METODOLOGÍAS DE RMN EN ANÁLISIS DE ALIMENTOS.	28
I.2.3.1. ESPECTROSCOPÍA DE RMN.	28
I.2.3.1.1. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS.	28
I.2.3.1.2. ESQUEMAS ADICIONALES DE ADQUISICIÓN.	34
I.2.3.1.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS EN DISOLUCIÓN.....	40
I.2.3.1.4. MUESTRAS SEMISÓLIDAS.	46
I.2.3.1.5. MUESTRAS SÓLIDAS.	47
I.2.3.2. IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA (IRM).	49
I.2.3.3. RELAXOMETRÍA.	52
I.2.3.4. RESONANCIA DE ESPÍN ELECTRÓNICO (REE).	54
I.3. ANÁLISIS METABOLÓMICO.	57
I.3.1. PRINCIPALES TIPOS DE ANÁLISIS METABOLÓMICOS.	60
I.3.1.1. ANÁLISIS DIRIGIDO (<i>TARGETED ANALYSIS</i>).	60
I.3.1.2. ANÁLISIS NO DIRIGIDO (<i>UNTARGETED ANALYSIS</i>).	61
I.3.1.2.1. ANÁLISIS DE PERFILES METABÓLICOS (<i>METABOLOMIC PROFILING</i>). ...	61
I.3.1.2.2. ANÁLISIS METABOLÓMICOS (<i>METABOLOMIC</i>).....	62
I.3.1.2.3. ANÁLISIS DE HUELLAS METABÓLICAS (<i>METABOLOMIC FINGERPRINTING</i>).....	62
I.3.2. PRINCIPALES TÉCNICAS DE ANÁLISIS.	64
I.3.3. PROCESADO DE LOS DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE ¹H-RMN.	69
I.3.4. METODOS QUIMIOMÉTRICOS DE ANÁLISIS.	72

I.3.4.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE.....	74
I.3.4.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.	75
I.3.4.2.1. ANÁLISIS NO SUPERVISADO DE EXPLORACIÓN.	77
I.3.4.2.2. ANÁLISIS SUPERVISADOS.	78
I.4. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPÍA DE RMN EN EL ANÁLISIS METABOLÓMICO DE MATRICES ALIMENTARIAS	81
I.4.1. APLICACIÓN EN EL ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS.....	86
I.4.2. APLICACIÓN EN EL CONTROL DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA	89
I.4.3. APLICACIÓN EN EL PROCESADO Y CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS	91
I.5. RETOS EN LA APLICACIÓN DE LA RMN EN EL ESTUDIO DE ALIMENTOS	93
II. OBJETIVOS.	97
III. PARTE EXPERIMENTAL.	101
III.1. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPÍA DE RMN AL ESTUDIO DE ACEITES VEGETALES.....	103
III.1.1. EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES COMESTIBLES MEDIANTE ¹ H-RMN.....	105
<i>Trabajo 1. "Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by ¹H-NMR".</i>	
III.1.2. AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE ¹ H-RMN.....	129
<i>Trabajo 2. "Automatic ¹H-NMR screening of fatty acid compositions in edible oils".</i>	
III.1.3. MONITORIZACIÓN DEL PROCESO DE OXIDACIÓN DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE ¹ H-RMN Y REE.	149
<i>Trabajo 3. "Deep-fat frying monitoring by ¹H-NMR and EPR of culinary oils versus cynara oil".</i>	
III.2. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPÍA DE RMN AL ESTUDIO DEL EFECTO DEL ALMACENAMIENTO Y DEL TRATAMIENTO CON RADIACIONES IONIZANTES (HACES DE ELECTRONES ACELERADOS) EN MIOSISTEMAS.....	177
III.2.1. APLICACIÓN EN MUESTRAS DE PESCADO.	179
III.2.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL MÚSCULO DE SALMON AHUMADO Y MONITORIZACIÓN DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN MEDIANTE HRMAS.	181
<i>Trabajo 4. "¹H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (Salmo salar)".</i>	

III.2.2. ESTUDIO MEDIANTE ^1H -RMN/HRMAS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE IRRADIACIÓN EN SALMÓN AHUMADO	203
<i>Trabajo 5. “^1H-HRMAS NMR study of cold smoked Atlantic salmon (Salmo salar) treated with E-beam”.</i>	
III.2.3. POTENCIAL DE LOS DERIVADOS DE METILAMINA COMO INDICADORES DEL TRATAMIENTO DE IRRADIACIÓN EN SALMÓN (SALMON SALAR)	217
<i>Trabajo 6. “Effect of E-beam treatment on the methylamine compounds in Atlantic Salmon”.</i>	
III.2.4. APLICACIÓN EN MUESTRAS CÁRNICAS	233
III.2.4.1. ESTUDIO METABOLÓMICO DEL EXUDADO CÁRNICO: POTENCIAL PARA LA MONITORIZACIÓN DEL ALMACENAMIENTO DE LA CARNE	235
<i>Trabajo 7. “Metabolomic of meat exudates: Its potential to evaluate conservation and aging”.</i>	
IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA.	265
IV.1. AVANCES DE LA DE LA RMN EN EL ANÁLISIS DE MATRICES ALIMENTARIAS.....	267
IV.1.1. OPTIMIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA ADQUISICIÓN.	269
IV.1.2. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE MEZCLAS ALIMENTARIAS.	271
IV.2. AVANCES EN EL ANÁLISIS METABOLÓMICO Y LA MONITORIZACIÓN DE DIFERENTES PROCESOS SOBRE MATRICES ALIMENTARIAS MEDIANTE RMN.	276
IV.2.1. DIFERENTES APROXIMACIONES EN EL ABORDAJE DE UN ANÁLISIS METABOLÓMICO.....	279
IV.2.2. APLICACIÓN AL ESTUDIO DEL ALMACENAMIENTO DE MATRICES ALIMENTARIAS.	282
IV.2.3. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE MÉTODOS DE CONSERVACIÓN: TRATAMIENTO DE IRRADIACION CON ELECTRONES ACELERADOS.	290
IV.2.4. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE PROCESOS DE OXIDACIÓN.....	297
IV.3. AVANCES EN LA AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS MEDIANTE RMN METABOLÓMICA DE MATRICES ALIMENTARIAS	
IV.3.1. AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE RMN.....	299
V. CONCLUSIONES.	303
VI. BIBLIOGRAFÍA.	307
VII. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.	323

RESUMEN / ABSTRACT

Resumen

AVANCES EN EL ESTUDIO DE MATRICES ALIMENTARIAS MEDIANTE RMN METABOLÓMICA.

Introducción

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica no destructiva que permite el análisis de las matrices complejas sin necesidad de pasos previos de derivatización y/o separación. Esta técnica permite el estudio de diversos componentes en un mismo ensayo lo que ha llevado a otorgarle el título de "detector universal". En general, la espectroscopía de RMN se ha utilizado en la elucidación de los compuestos químicos en disolución, pero en los últimos años su aplicación en el campo de los alimentos, junto con la más reciente de las tecnologías ómicas, la Metabolómica, ha abierto nuevas perspectivas, permitiendo cambiar e incrementar los objetivos en el estudio de muestras alimentarias. Pero como cualquier metodología analítica emergente, exige la búsqueda y mejora de una serie de aspectos experimentales, tanto desde el punto de vista de la RMN Metabolómica como de los posibles sistemas a estudiar.

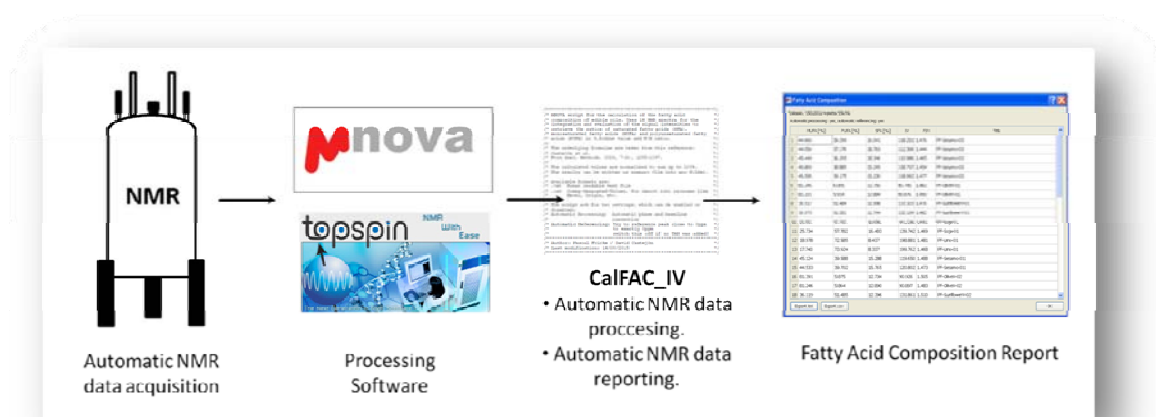
Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis fue aplicar la espectroscopía de RMN, junto con el análisis metabolómico, al estudio de alimentos. Se ha pretendido avanzar en la necesaria optimización y estandarización de esta metodología en lo referente a la toma de muestra, su preparación, la adquisición de los datos espectroscópicos y su posterior procesado. Para ello se estudiaron distintas matrices alimentarias, evaluando diversos procesos y monitorizando los cambios metabólicos producidos en el afán de establecer pautas experimentales que acerquen la RMN metabolómica al marco alimentario

Resultados

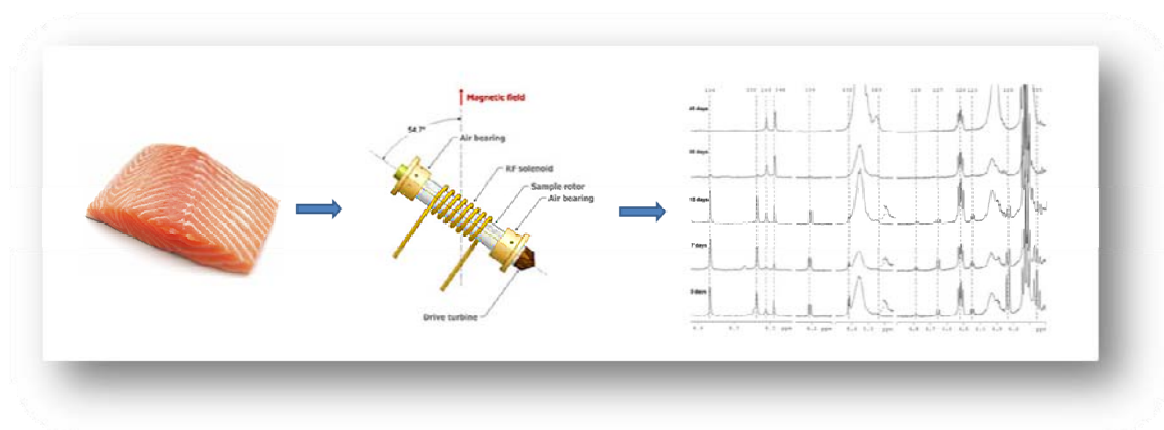
Se han desarrollado varias etapas en las que se han afrontado distintos objetivos parciales como seguidamente se indica. Los resultados obtenidos han dado lugar a siete artículos incluidos en la memoria.

- **1. Optimización y automatización del análisis de aceites vegetales.** El trabajo desarrollado en aceites vegetales ha permitido dar un paso importante en la normalización del análisis de ácidos grasos mediante RMN. La optimización del método ha permitido obtener el perfil de ácidos grasos en tiempos inferiores a un 1 minuto y con la misma precisión que el método oficial (*GC-FID*). Los buenos resultados obtenidos mediante RMN de alta resolución, a alto campo, se han reproducido satisfactoriamente a bajo campo, donde se ha optimizado y verificado que es posible llevar a cabo el análisis de forma automática. Asimismo, se ha automatizado el procesado y el cálculo de ácidos grasos. Para ello se han desarrollado dos programas para las principales plataformas utilizadas en el procesado de los datos de RMN (*MestReNova* y *TopSpin*). El programa efectúa un análisis completo y desde la preparación de muestra (mínima) a la obtención del informe, requiere tan solo unos pocos minutos (~ 3 min). El método desarrollado es altamente competitivo como técnica fundamental en el cribado de alto rendimiento tanto en la industria como en los laboratorios de control alimentario.



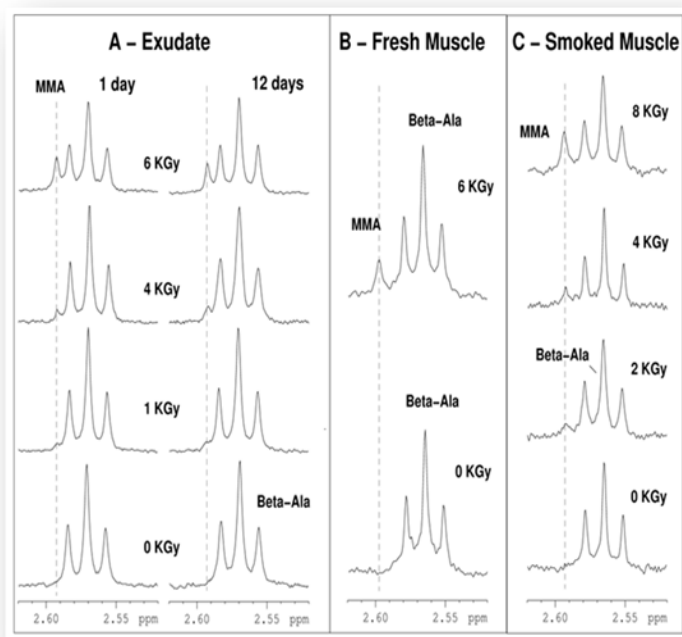
- **2. Correlación RMN versus REE. Revalorización del aceite de cardo.** La ^1H -RMN ha demostrado ser una técnica rápida y eficaz para determinar la composición nutricional y la degradación oxidativa de los aceites durante la fritura. Por primera vez se han correlacionado la estabilidad oxidativa medida por resonancia de espín electrónico y el contenido de aldehídos totales obtenidos mediante RMN. Además, en base a su perfil de ácidos grasos y su comportamiento frente a la fritura, se propone el aceite de cardo para el uso culinario.

- **3. Desarrollo de bases de datos metabolómicas.** Se ha realizado un exhaustivo trabajo de asignación por el que se ha incrementado sustancialmente el número de los metabolitos identificados en las diferentes matrices estudiadas (salmón, ternera y aceites vegetales). Sin duda que allanará el camino en próximas investigaciones.
- **4. Monitorización de procesos de almacenamiento y conservación en alimentos.** La espectroscopía de RMN es una herramienta útil para monitorizar la evolución de distintas matrices alimentarias (cárnicas y de pescado) durante su almacenamiento, permitiendo en cada momento seguir de forma simultánea las diferentes reacciones químicas que acontecen. Por otra parte, se ha demostrado la capacidad de esta metodología para discernir el efecto conservador de distintos tratamientos aplicados a los alimentos. En concreto se han podido constatar los resultados de la aplicación de radiación Beta sobre los procesos de degradación y ajustar la dosis necesaria para aumentar la vida útil del producto.



- **5. Exudado, el fiel reflejo de un miosistema.** Se ha utilizado una nueva matriz de análisis en el estudio mediante RMN Metabolómica: el exudado. Se ha demostrado que el exudado es un fiel reflejo de la muestra de músculo de la que proviene y permite monitorizar los mismos procesos previamente descritos en miosistemas. El exudado se propone como material de estudio de miosistemas en el análisis no destructivo.
- **6. Monometilamina como indicador de irradiación.** Los estudios desarrollados en muestras de músculo tanto de salmón ahumado como fresco y de exudado, han permitido identificar un metabolito, la

monometilamina (MMA), como posible marcador del tratamiento de irradiación en pescado. Los resultados han mostrado que la señal de la MMA únicamente estaba presente en las muestras irradiadas, su intensidad era proporcional a la dosis de irradiación aplicada y además, la MMA se mantenía estable durante todo el tiempo de almacenamiento. La combinación MMA, exudado y RMN presenta un gran potencial en el análisis y control de pescado irradiado.

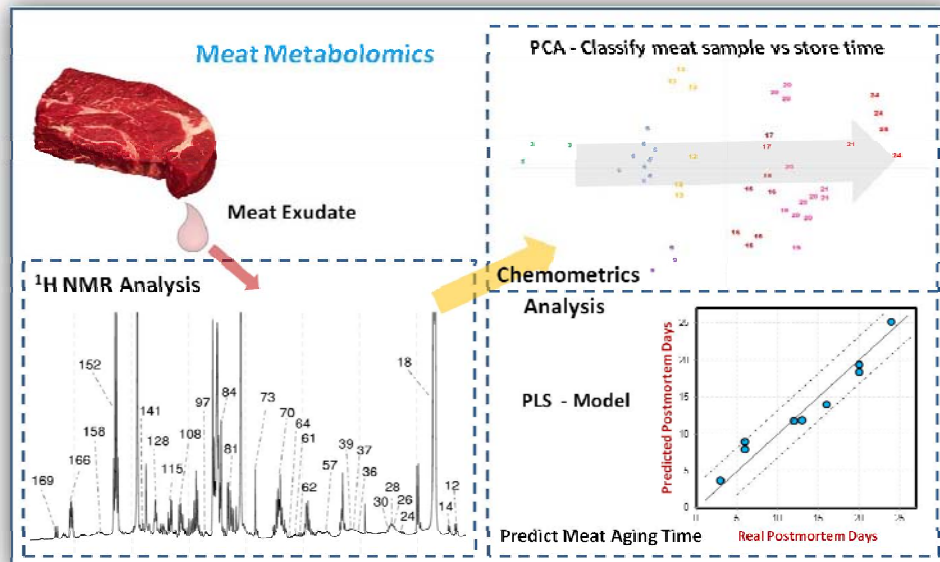


- **7. Clasificación y predicción del tiempo *postmortem* en muestras de ternera.** Se ha desarrollado el primer estudio de RMN de exudados cárnicos que permite monitorizar los cambios del perfil metabólico asociados al envejecimiento de la carne. El uso combinado de la RMN con las técnicas de análisis multivariante permitió clasificar las muestras cárnicas de acuerdo con su tiempo *postmortem* y, después de la adecuada calibración, predecir su tiempo de envejecimiento.

Conclusiones

Como resumen se puede afirmar que los resultados obtenidos permiten concluir que las técnicas espectroscópicas de RMN Metabólica presentan un elevado potencial para la monitorización de los procesos aplicados en la industria alimentaria, la trazabilidad y el control de calidad de matrices íntegras

de diversa naturaleza, siendo posible la automatización del análisis de muestras sin, o con una mínima preparación previa.



Abstract

ADVANCES IN THE STUDY OF FOOD MATRICES BY NMR-BASED METABOLOMIC.

Introduction

Spectroscopy of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a non-destructive analytical technique that can be used to study complex matrices without the need for previous derivatisation and/or separation. With this technique, several components can be studied in the same assay, so it is often referred to as a universal detector. Generally, NMR spectroscopy has been used to analyze chemical compounds in solution, but its application in foods in the last few years, combined with the most recent omic technologies, metabolomics, has opened up new perspectives, thus allowing to change and to increase the aims of food samples studies. However, as occurs with any emerging analytical methodology, it is necessary to improve several experimental aspects, both from the perspective of NMR-based Metabolomic and the possible systems that can be studied.

Objectives

The main objective of this thesis is to apply NMR spectroscopy, together with metabolomic analysis, to the study of foods. An attempt has been made to further optimize and standardize this methodology in relation to sampling, sample preparation, spectroscopic data gathering, and processing of the results obtained. For this purpose, different food matrices have been studied, several food processing technologies have been assessed and the metabolic changes produced have been monitored in order to establish experimental guidelines for the application of NMR-based metabolomics to the study of food.

Results

Several stages were defined in which the following partial objectives were tackled. The results obtained have been reported in seven research papers included in this PhD Thesis.

- **1. Optimization and automation of the analysis of vegetable oils.** The work carried out on vegetable oils has allowed to standardize the analysis of fatty acids by NMR. Once the method has been optimized, the fatty acid profile can be obtained in less than 1 minute with the same precision as the official technique (GC-FID). The excellent results obtained by high-field high resolution NMR have also been satisfactorily reproduced at low field. This technique has been optimized and the analysis has been successfully automated. The processing and calculation of the fatty acids content have, also, been automated. A computer program has been developed in order to be integrated in the two main platforms used for processing NMR data (*MestReNova* and *Topspin*). The program performs a complete analysis in a few minutes (~ 3 min) requiring only a minimum sample preparation to obtain the report. The developed method is highly competitive as an essential technique in high-throughput screening for both industry and food control laboratories

- **2. Correlation of NMR versus ESR. Valorization of thistle oil.** ^1H -NMR has proven to be a quick and effective technique to determine the nutritional composition and the oxidative degradation of oils during frying. For the first time, the oil oxidative stability measured by electron spin resonance and the content of total aldehydes obtained by NMR have been correlated. Moreover, on the basis of its fatty acid profile and frying behavior, thistle oil is proposed for culinary use.

- **3. Development of a metabolomic data base.** The exhaustive work done assigning metabolites has substantially increased the number of identified metabolites in the matrices studied (salmon, beef, and vegetable oils). This will undoubtedly help to pave the way for future research.

- **4. Monitoring of food storage and preservation processes.** NMR spectroscopy is a useful tool to monitor changes in a variety of food matrices (of both meat and fish origin) during storage. It allows to follow, simultaneously different chemical reactions that are taking place at any time. The preservative effect of different food treatments can be also determined with this technique. More specifically, the effects of E-beam

irradiation treatment on food degradation as well as the dose adjustments required to enhance the shelf-life of the product have been established.

- **5. Exudate, a reliable image of a myosystem.** A new food matrix has been analyzed in NMR-based Metabolomics, namely exudate. Exudate has been demonstrated to faithfully reflect the muscle from which it comes, and can be used to monitor the same processes that were previously described in myosystems. Exudate is proposed as a material to study myosystems using non-destructive analysis.
- **6. Monomethylamine as an indicator of irradiation.** From studies in muscle samples from smoked salmon, fresh salmon and exudate, the metabolite monomethylamine (MMA) has been identified as a possible irradiation treatment indicator in fish. The results have shown that the MMA signal was only present in irradiated fish samples. Furthermore, the intensity of MMA signal was proportional to the irradiation dose applied, and MMA was stable over the entire storage time. The combination of MMA, exudates and NMR show great potential for the analysis and control of irradiated fish.
- **7. Classification and prediction of *postmortem* time in beef samples.** In this PhD Thesis, for the first time, an NMR study of beef exudates has been developed to monitor the changes in metabolic profiles associated with meat aging. Meat samples can be classified according to *postmortem* time by combining NMR and multivariate analytical techniques. The meat aging time can also be estimated after applying a suitable calibration procedure.

Final conclusion

In summary, from the results obtained in this PhD Thesis it can be concluded that the spectroscopic techniques of NMR-based Metabolomic offer great potential for monitoring a wide range of processes used in the food industry as well as for the traceability and quality control of food matrices. Moreover, food analysis can be automated with no preparation, or only minimal preparation.

I. INTRODUCCIÓN

I. Introducción.

I.1 Técnicas analíticas en el análisis químico de alimentos.

La Química y el Análisis de los Alimentos son disciplinas muy amplias que se basan en los principios de la Fisicoquímica, Química Orgánica, Biología y Química Analítica. Los avances realizados en estas ciencias en los siglos XIX y XX han tenido un importante efecto en la comprensión de muchos aspectos de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos y han sido decisivos para la mejora de la calidad y disponibilidad de alimentos a nivel mundial.

El Análisis de los Alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, uso y estudio de los procedimientos analíticos para evaluar las características de los alimentos y de sus componentes. Esta información es crítica para el entendimiento de los factores que determinan las propiedades de los alimentos, así como para producir alimentos que sean consistentemente seguros, nutritivos y deseables para el consumidor.

Existe un número considerable de técnicas analíticas para determinar una propiedad particular del alimento. De ahí que sea necesario seleccionar la más apropiada para una aplicación específica. La elección de la técnica dependerá de la propiedad a determinar, del tipo de alimento a analizar y de la razón de llevar a cabo el análisis.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica de investigación que, con una preparación de muestra mínima, ofrece la posibilidad de obtener información cuantitativa y estructural de cualquier molécula. Los principales componentes de los alimentos presentan elementos, tales como Hidrógeno, Carbono, Nitrógeno, Fósforo y Oxígeno que tienen al menos un isótopo detectable por espectroscopía de RMN. Además, esta técnica permite el estudio de diversos componentes en un mismo ensayo lo que ha llevado a otorgarle el título de "detector universal". En los últimos años, la aplicación de esta técnica de alto rendimiento está permitiendo cambiar e incrementar los objetivos del análisis de alimentos.¹

¹ Laghi, L.; Picone, G.; Capozzi, F. *Trends Anal. Chem.* **2014**, 59, 93-102.

I.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.

I.2.1. Antecedentes. Contexto Histórico.

La espectroscopía aborda el estudio de la interacción entre de la materia (átomos o moléculas) con la radiación electromagnética. La RMN es una técnica espectroscópica que estudia tal interacción basándose en las propiedades magnéticas intrínsecas de los núcleos atómicos. Desde la primera vez que se observó el fenómeno de la RMN, esta técnica ha experimentado un crecimiento sin precedentes como técnica analítica. La lista de las diferentes áreas del conocimiento en las que hoy en día se aplica la RMN aumenta continuamente. Entre las más destacadas se encuentran la química, la biología, la medicina, la ciencia de los materiales, la geología y más recientemente, áreas de seguridad y calidad alimentaria.²

El origen de la espectroscopía de RMN se inicia con el físico austriaco Wolfgang Pauli (1900-1958), conocido por la proposición del cuarto número cuántico, “el espín del electrón” (1924), y su famosísimo principio de exclusión, que rige la posible posición de los electrones en los orbitales atómicos (1925). En los años veinte, Pauli demostró que muchas de las características de la estructura hiperfina de los espectros atómicos se podían explicar a través del movimiento de espín de los núcleos atómicos y del correspondiente momento magnético generado. Posteriormente, en 1933, Otto Stern (Universidad de Carnegie Mellon) calculó el momento magnético del núcleo de hidrógeno (protón) mediante la técnica de haces moleculares en un campo no homogéneo.³ En 1938, Isidor Isaac Rabi (Universidad de Columbia), publicó “*A new method of measuring nuclear moment*” en el que acuñó la denominación de “Espectroscopía por radiofrecuencia” para referirse a una incipiente RMN.⁴ Ambos recibieron por estos importantes avances el Premio Nobel de Física en 1943 y 1944 respectivamente.



² Emsley, J. W.; Feeney, J. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, 50, 179-198.

³ Frisch, R.; Stern, O. *Z. Phys.* **1933**, 85, 4-16.

⁴ Rabi, I. I., et al. *Phys. Rev.* **1939**, 55, 526-535.

Tras la segunda guerra mundial, dos grupos de Estados Unidos dirigidos por el físico suizo Félix Bloch (Universidad de Stanford) y el ingeniero eléctrico estadounidense Edward M. Purcell (Universidad de Harvard) retomaron la investigación sobre la resonancia magnética de la materia condensada.⁵ Ambos grupos desarrollaron en diciembre de 1945, de manera independiente, nuevos métodos que les permitieron medir por primera vez la señal de resonancia.⁶ Estos científicos compartieron el Premio Nobel de Física en 1952.



En 1949 E.L. Hahn consiguió producir una corta excitación del espín nuclear utilizando un pulso de radiofrecuencia. Esta excitación momentánea, a continuación, podía ser registrada en forma de señal eléctrica inducida en una bobina convenientemente situada. Esta señal inducida es la que hoy en día se conoce con el nombre de FID (*Free Induction Decay*).⁷ En enero de 1950, dos grupos independientes publicaron en el mismo número de la revista *Physical Review* que la frecuencia de resonancia de los núcleos depende no solo de la intensidad del campo magnético y de la naturaleza del núcleo atómico, sino también de su ambiente químico.^{8,9} También en ese año, H.S. Gutowsky y C.J. Hoffman, descubrieron el fenómeno conocido como acoplamiento escalar o acoplamiento espín-espín, que se produce cuando dos grupos de núcleos magnéticos no equivalentes interactúan entre sí, originando el desdoblamiento mutuo de sus señales.¹⁰ Se establecían así las bases físicas que han permitido desarrollar el gran potencial de la RMN como herramienta para la elucidación estructural.

En 1966, el químico-físico suizo Richard R. Ernst publicó un extraordinario avance que cambiaría el desarrollo de la RMN: "*Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance*". Este trabajo explica cómo la señal

⁵ Sánchez-Ferrando, F. "Breve resumen histórico de la resonancia magnética nuclear." http://www.germn.org/documentacion/cat_view/4-cursos/7-presentaciones-de-la-escuela-de-verano-curso-avanzado-de-resonancia-magnetica-nuclear-jaca-2005?start=10.

⁶ Los artículos en que dan cuenta de sus resultados aparecieron juntos en la revista *Physical Review*, en enero de 1946, vol. 69: "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid" de Purcell et al., p. 37-38 y "Nuclear induction" de Bloch et al., p. 460-464.

⁷ Hahn, E. L. *Phys. Rev.* **1950**, 77, 297-298.

⁸ Proctor, W. G.; F. C. Yu. *Phys. Rev.*, **1950**, 77, 717.

⁹ Dickinson, W. C. *Phys. Rev.*, **1950**, 77, 736-737.

¹⁰ Gutowsky, H. S.; Hoffman, C. J. *Phys. Rev.* **1950**, 80, 110-111.

emitida por los núcleos en función del tiempo, que contiene información sobre todas las frecuencias de resonancia, puede ser convertida en una señal en el dominio de las frecuencias aplicando un algoritmo matemático conocido como Transformada de Fourier (TF). Curiosamente, este trabajo fundamental fue rechazado dos veces en el *Journal of Chemical Physics* por ser muy técnico y no lo suficientemente original. En 1971 el científico belga Jean Jeener, concibió por primera vez la idea de expandir en dos dimensiones la información contenida dentro de un experimento monodimensional de RMN.¹¹ Sin embargo, fueron Richard R. Ernst (ETH de Zúrich) y sus colaboradores quienes entre los años 1975-1976, desarrollaron de manera más rigurosa el concepto de la RMN bidimensional (RMN 2D) e introdujeron las primeras aplicaciones.¹² Richard R. Ernst fue distinguido con el premio nobel de Química en 1991 por su gran contribución al avance de la espectroscopía de RMN.



En 1973 se produjeron avances fundamentales en la aplicación de la RMN a la medicina, cuando el químico estadounidense Paul Lauterbur (Universidad Estatal de New York) codificó espacialmente la señal de RMN mediante la aplicación de gradientes magnéticos¹³ y el físico inglés Peter Mansfield descubrió de forma independiente que el empleo de gradientes de campo magnético producía señales que proporcionaban información espacial, introduciendo el concepto de espacio-K.¹⁴ Por estos y posteriores avances ambos investigadores fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina del año 2003.

A comienzos de la década de los 80, Kurt Wütrich (ETH de Zúrich) estudió la aplicación de la RMN a la elucidación estructural de proteínas, desarrollando procedimientos generales para la asignación sistemática de las frecuencias de resonancia de los diferentes núcleos magnéticos de estas biomoléculas, así como para la determinación de las distancias entre ellos a partir del *Efecto*

¹¹ Jeener, J. Ampere International Summer School II, Basko Polje, Yugoslavia, 1971, (no publicado).

¹² Aue, W.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.*, **1976**, *64*, 2229-2246.

¹³ Lauterbur, P. C. *Nature* **1973**, *242*, 190-191.

¹⁴ Mansfield, P.; Grannell, P. K. *J. Phys. C* **1973**, *6*, L422.



Nuclear Overhauser (NOE). Wüthrich demostró que a partir de esta información se podía llegar a deducir la estructura tridimensional de determinadas proteínas, con la ventaja añadida de que tal elucidación estructural mediante RMN correspondía a las proteínas en disolución, es decir, en un medio ambiente similar al de la célula viva. Por su brillante contribución, Kurt Wüthrich recibió el Premio Nobel de Química en el año 2002.¹⁵

Años atrás, en 1974, Hoult et al. habían demostrado que la espectroscopía de RMN se podía utilizar para la detección de metabolitos en muestras biológicas intactas.¹⁶ En este primer estudio de músculo mediante RMN *in vivo*, se pudo demostrar que el 90% del ATP (Adenosín Trifosfato) celular se encuentra complejoado con magnesio.

La sensibilidad de la RMN ha ido aumentando a lo largo de todos estos años gracias a la utilización de campos magnéticos cada vez más intensos y de la construcción de nuevas sondas. Con ello, la RMN ha ido ganando protagonismo como una técnica cada vez más importante para la elucidación estructural de moléculas aisladas y para la investigación del metabolismo, tanto *in vitro* como *in vivo*. En la aplicación de la espectroscopía de RMN al análisis de muestras biológicas, cabe destacar los estudios llevados a cabo por Jeremy K. Nicholson (*Imperial College*, Londres). Así, este autor demostró en 1984, que la espectroscopía de RMN posee el potencial adecuado para su aplicación en el diagnóstico de la *diabetes mellitus*.¹⁷ Posteriormente, abordó la aplicación de métodos de reconocimiento de patrones metabólicos basados en datos de RMN.¹⁸ Nicholson propuso en el año 2000 el término de *Metabonomía* para hacer referencia a “la medición cuantitativa de la respuesta metabólica de naturaleza dinámica y multiparamétrica de los sistemas vivos ante estímulos patofisiológicos o bien, ante la modificación genética”. En el campo de la Metabonomía, la espectroscopía de RMN, junto con la espectroscopía de masas, son sin duda, técnicas analíticas esenciales.¹⁹



¹⁵ Wüthrich, K. *Experientia* **1974**, 30, 577-585.

¹⁶ Hoult, D.; Busby, S.; Gadian, D.; Radda, G.; Richards, R.; Seeley, P. *Nature* **1974**, 252, 285-287.

¹⁷ Bales, J. R.; Higham, D.P.; Howe, I.; Nicholson, J. K.; Sadler, P. J. *Clin. Chem.* **1984**, 30, 426-432.

¹⁸ Lenz, E. M.; Wilson, I. D. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 443-458.

¹⁹ Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Everett, J. R. *Concepts Magn. Reson.* **2000**, 12, 289-320.

Los metabolitos son moléculas que resultan de la actividad celular y por tanto, sirven como medida directa de su actividad. El análisis completo del *metaboloma* de un sistema biológico que se encuentra en unas condiciones determinadas se denomina *Metabolómica*.²⁰ Con ella se entra así de lleno en el terreno de las tecnologías *Ómicas*: la aplicación de la *Metabolómica* al estudio de muestras alimentarias (junto con la genómica y la proteómica) ha dado lugar a lo que hoy se conoce como *Foodómica*, que constituye una nueva disciplina para una nueva era en el estudio de alimentos.²¹

1.2.2. Principios de la técnica.

La RMN es una técnica espectroscópica que estudia la absorción y emisión de radiación electromagnética por los núcleos de ciertos átomos bajo la influencia de un campo magnético.²² Los núcleos atómicos son entidades cargadas que poseen un movimiento de espín y como consecuencia, originan un campo magnético, dependiente de la dotación nuclear, que se puede caracterizar por un vector momento magnético (μ) cuya dirección es aleatoria. Se trata pues de un sistema con niveles de energía degenerados independientes de la orientación del vector μ . Al aplicar un campo magnético de intensidad B_0 en una determinada dirección (Z), la interacción con el núcleo en movimiento (espín) da lugar a que el momento magnético μ efectúe un *movimiento de precesión*. La frecuencia de precesión ν_0 (*frecuencia de Larmor*) depende de γ (relación giromagnética del núcleo) y de B_0 (intensidad del campo magnético aplicado) (Figura I.1).

Los niveles de energía del sistema nuclear sometido a un campo magnético, dejan de ser degenerados. La energía se encuentra ahora cuantizada y depende de las diferentes orientaciones que puede adoptar el momento magnético nuclear μ respecto del campo magnético externo B_0 . El número de niveles energéticos posibles vendrá definido por los diferentes valores que puede adoptar el número cuántico de espín del núcleo (I). Esta es una característica individual del núcleo que depende de su dotación de cargas

²⁰ Fiehn, O. *Comp. Funct. Genomics* **2001**, 2, 155-168.

²¹ García-Cañas, V.; Simó, C.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 10150-10159.

²² Una excelente introducción a los fundamentos de la RMN puede encontrarse en: Günther, H. *NMR Spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim 2013. Consultar también: Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy*, Wiley&Sons, Cambridge 2010.

nucleares. Para que un núcleo pueda interaccionar con un campo magnético externo dando lugar a posibles diferentes niveles energéticos, es necesario que su número cuántico de espín sea distinto de cero. Este es el caso de la mayoría de los elementos de la tabla periódica que poseen, al menos, un isótopo con $I \neq 0$ (p. ej., ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{23}Na , ^{27}Al , ^{31}P , ^{29}Si). La acción del campo magnético va a producir un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del espín nuclear. La magnitud del desdoblamiento producido es proporcional a la intensidad B_0 del campo magnético aplicado.

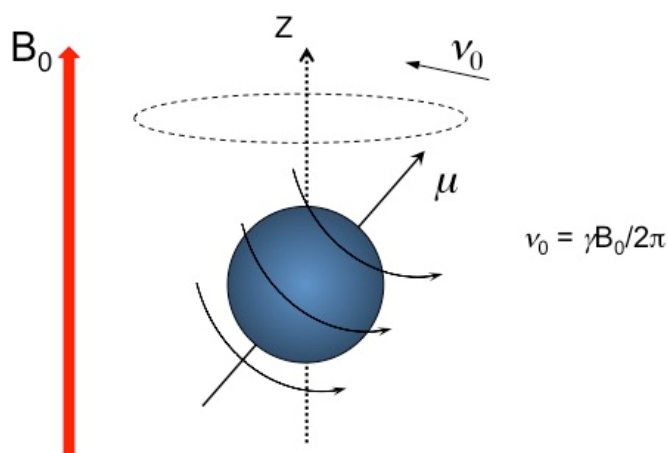


Figura I.1. Los átomos pueden considerarse como pequeños imanes, caracterizados por un vector momento magnético (μ), cuya interacción con un campo magnético externo produce un movimiento de precesión de μ con una frecuencia ν_0 .

En la Figura I.2 se representa el desdoblamiento de niveles que se observa para un núcleo con número cuántico de espín $I = \frac{1}{2}$. Se podrán adoptar dos estados energéticos diferentes α y β . El α ($m_I = +\frac{1}{2}$)²³ es el más estable y corresponde al estado en el que las direcciones del campo magnético y del sentido de precesión son paralelas, mientras que en el de superior energía β ($m_I = -\frac{1}{2}$), las direcciones son antiparalelas. Entre los estados α y β se podrán producir transiciones energéticas como consecuencia de la irradiación electromagnética con una energía adecuada ΔE (Figura I.2).

²³ Donde m_I es el número cuántico magnético. Para un núcleo dado, el número total de estados posibles del momento angular es $(2I+1)$.

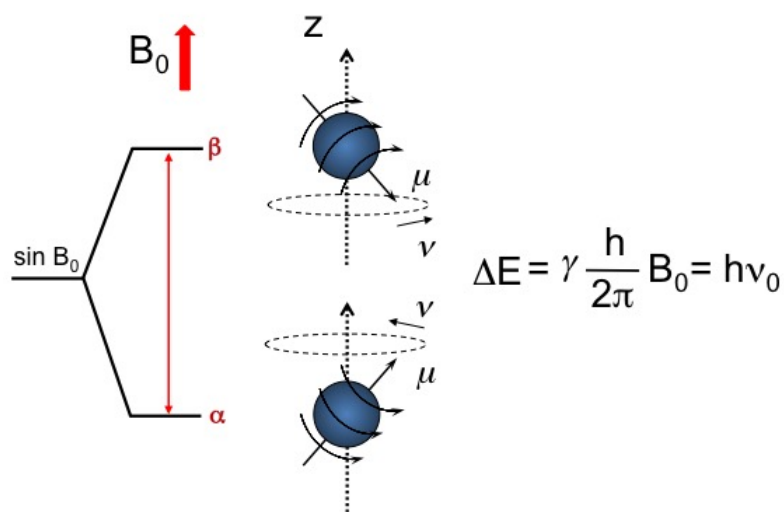


Figura I.2. Desdoblamiento de niveles energéticos producido al introducir un núcleo con número cuántico de espín $I=1/2$ en un campo magnético.

La diferencia energética ΔE entre los dos estados α y β es muy pequeña por lo que la radiación necesaria para la transición entre los dos estados se encuentra en la zona menos energética y de mayor longitud de onda del espectro electromagnético, que es la zona de las ondas de radio (Figura I.3). La irradiación con fuentes energéticas en el rango de las radiofrecuencias, será pues capaz de producir transiciones energéticas entre los niveles de RMN. La transición se producirá (*resonancia*) cuando la frecuencia de la radiofrecuencia empleada (*frecuencia de resonancia*), coincida con la frecuencia de precesión del núcleo.

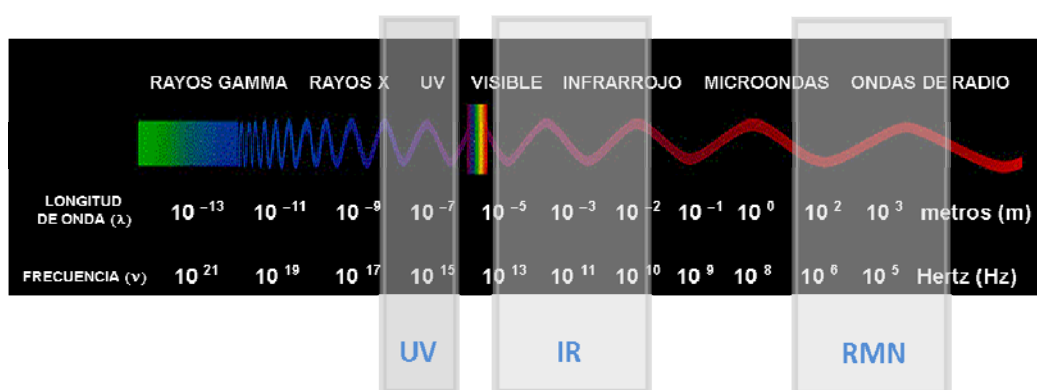


Figura I.3. Zonas del espectro electromagnético. La radiación necesaria para la RMN está en la zona energética de las radiofrecuencias, excitando con ello los núcleos individuales de la molécula.

La proximidad energética entre los niveles implicados en RMN da lugar a que sus poblaciones sean muy parecidas, a diferencia de otras técnicas

espectroscópicas como la espectroscopía de Infrarrojo (IR) o la espectroscopía Ultravioleta (UV). Por ello, en una muestra macroscópica, compuesta por un conjunto de núcleos, solamente un número de ellos ligeramente superior a la mitad adoptará el estado de menor energía α , mientras que otro ligeramente inferior a la mitad se encontrará en el estado de mayor energía β (Figura I.4A). Como consecuencia de ello se generará una magnetización resultante cuya dirección es la de aplicación del campo magnético B_0 . Se denomina *magnetización longitudinal*, M_0 (Figura I.4B).

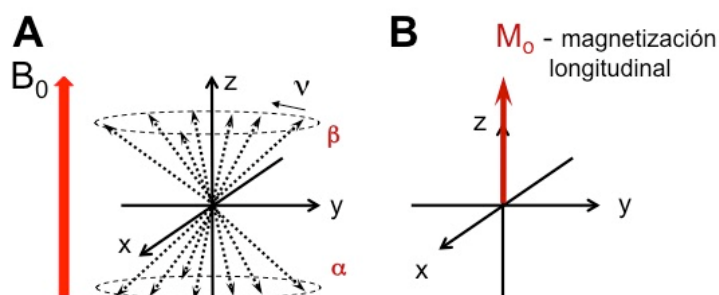


Figura I.4. A) Representación de la distribución de un conjunto de núcleos entre los niveles de energía α y β alineados paralela y antiparalelamente respecto de B_0 . B) Magnetización longitudinal resultante.

La aplicación en estas condiciones de una radiación de radiofrecuencias, hará entrar en resonancia a un cierto número de núcleos y, por tanto, afectará a la distribución poblacional de los espines nucleares adoptantes de los estados α y β . De forma similar a lo que sucede en otras técnicas espectroscópicas como IR, la excitación de los núcleos se realiza mediante la aplicación de *pulsos* con unas características de anchura de banda de frecuencia, potencia y duración que posibilitan que núcleos con distintas frecuencias de resonancia se exciten de forma simultánea. De esta forma, en función de las características de la radiación aplicada, por medio de una *bobina emisora* dispuesta a lo largo del eje x, la magnetización longitudinal M_0 se desviará un cierto ángulo θ de su alineamiento inicial en la dirección z (Figura I.5).²⁴

La resonancia da lugar a un aumento de la energía del sistema, simultáneo con la generación de una componente de la magnetización en el

²⁴ Para los fundamentos del trabajo experimental en RMN: Claridge, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Pergamon, Oxford 1999. Berger, S.; Braun, S. 200 and More NMR Experiments, Wiley-VCH, Weinheim 2004.

plano transversal xy , denominada *magnetización transversal* M_{xy} . La medida de la señal de resonancia se efectúa por medio de una bobina receptora dispuesta a lo largo del eje y , que registra la variación con el tiempo y la intensidad de la magnetización M_y . Ésta produce una señal eléctrica proporcional a su magnitud. Al cesar el pulso de excitación se inicia el proceso de *relajación*. En RMN, este proceso presenta una escala de tiempos que puede abarcar desde los milisegundos hasta los segundos. Esto la distingue de otras técnicas espectroscópicas como UV o IR, con tiempos de relajación sensiblemente inferiores. La razón de esta diferencia radica en la gran proximidad entre los niveles energéticos implicados en RMN, motivo que hace posible la generación de secuencias complejas de excitación y manipulación de los espines nucleares. También se deriva de ello un aspecto negativo de la RMN, como es su baja sensibilidad al ser próximas las poblaciones de los niveles energéticos implicados.

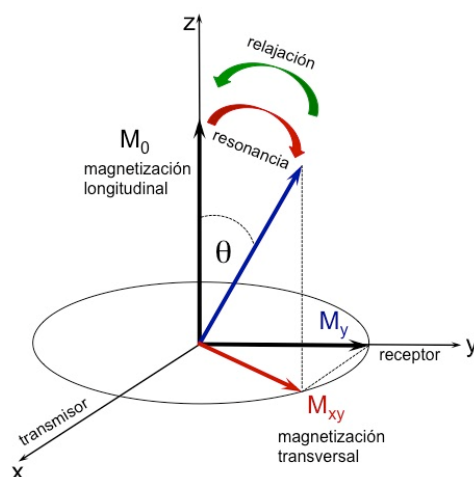


Figura I.5. Magnetización longitudinal M_0 y generación de la magnetización transversal M_{xy} .

En el instante en el que termina la excitación mediante el pulso de radiofrecuencias, la señal detectada muestra un máximo de intensidad y a partir de este momento el sistema tiende a volver al estado inicial y la señal que registra el detector va a consistir en una curva sinusoidal amortiguada, denominada *FID* (*Free Induction Decay*). Se trata de una señal dependiente del tiempo $f(t)$, que recoge todas las señales de resonancia individuales generadas por los núcleos presentes que posean frecuencias de resonancia diferentes (*núcleos anisocronos*). La FID se adquiere durante un intervalo t_2 (*tiempo de adquisición*) y seguidamente se la somete a un proceso de digitalización y

almacenamiento. Esta situación se repite el número n de veces que sea necesario hasta alcanzar una FID acumulada con la intensidad o relación señal/ruido (S/R) suficiente. La señal obtenida (*FID acumulada*) dependiente del tiempo, $f(t_2)$, contiene la información del experimento de RMN, pero no es útil desde un punto de vista del análisis estructural.

Para poder establecer correlaciones estructurales es necesario convertir la FID en una señal dependiente de las frecuencias que permita extraer la información espectroscópica, $f(\nu_2)$. Con esta finalidad se aplica un algoritmo matemático conocido como la *Transformada de Fourier* (TF), lo que da lugar finalmente a un espectro de RMN 1D. En la Figura I.6 se ilustra este proceso.

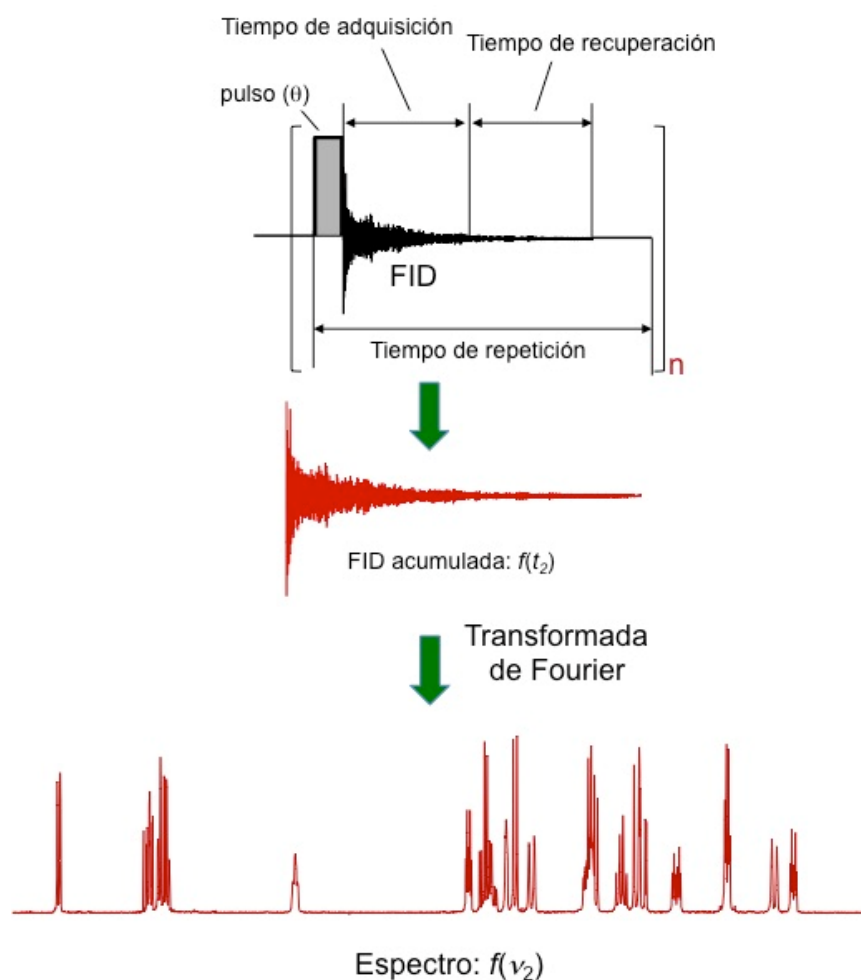


Figura I.6. Esquema básico de un espectro de RMN 1D y etapas del experimento: Excitación, adquisición, recuperación. Registro de la FID, acumulación y transformada de Fourier.

La frecuencia y multiplicidad de las señales obtenidas (p.e. en el espectro 1D de ^1H -RMN), ofrecen información sobre el tipo y número de núcleos

anisocronos que contiene la molécula estudiada. La posición de la señal de RMN, generalmente expresada a través del denominado *desplazamiento químico* (δ), permite disponer de datos sobre el entorno estructural del núcleo al que pertenezca. Se trata de un parámetro que refleja con gran precisión el entorno estructural del núcleo considerado. Ello se muestra en la Figura I.7 en la que se reflejan datos acerca de la zona del espectro y el tipo de núcleos en ^1H -RMN que en ella aparecen.

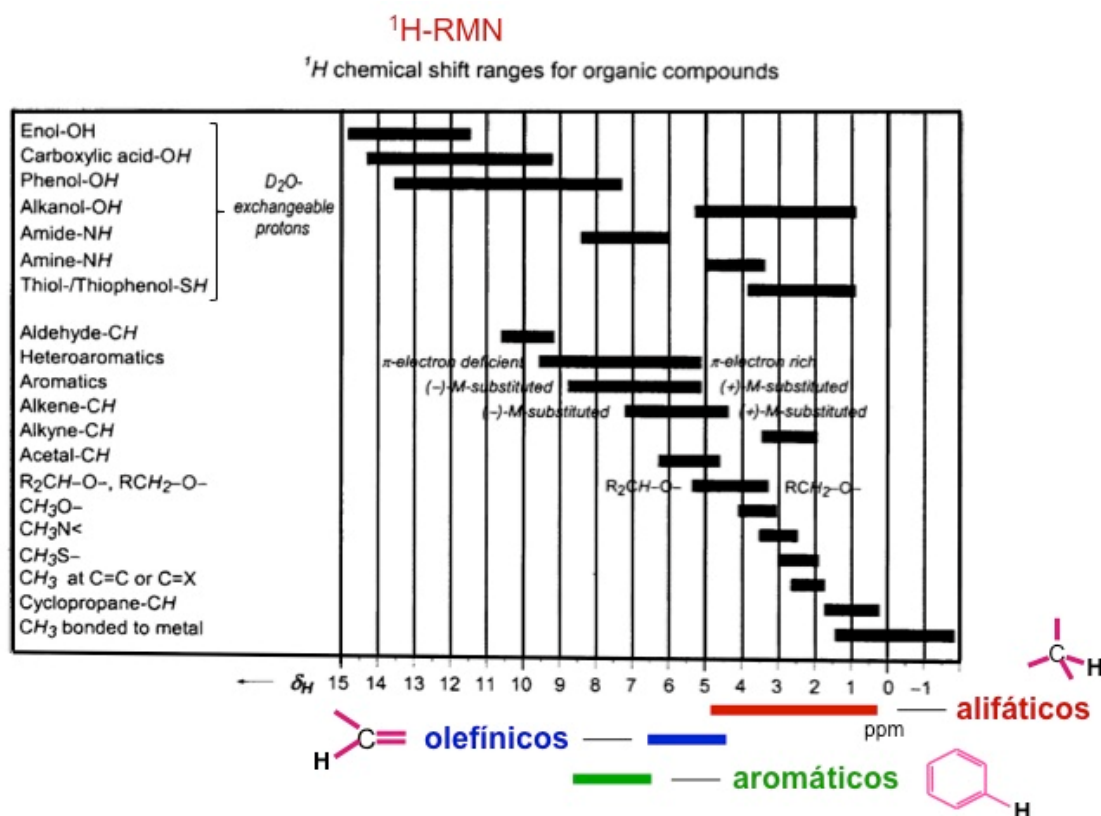


Figura I.7. Zonas del espectro en las que aparecen diferentes tipos de núcleos de hidrógeno y su desplazamiento químico.

A partir de la multiplicidad que se observa en las señales de resonancia, se obtienen datos acerca de las interacciones establecidas entre los núcleos de la molécula través de los enlaces (acoplamiento escalares). Los espectros de RMN permiten asimismo establecer la existencia de acoplamiento dipolares (a través del espacio), que permiten precisar la proximidad existente entre los núcleos de H.

Los espectros bidimensionales de RMN ofrecen una información superior ya que la posición y la multiplicidad de las señales obtenidas dependen de dos variables estructurales (p.e. $\delta_{1\text{H}}$, $\delta_{13\text{C}}$). Incluyen etapas adicionales de *evolución*,

que introduce en el experimento una segunda variable temporal y de *mezcla*, a través de la que se establece el tipo de información que se desea obtener (Figura I.8).

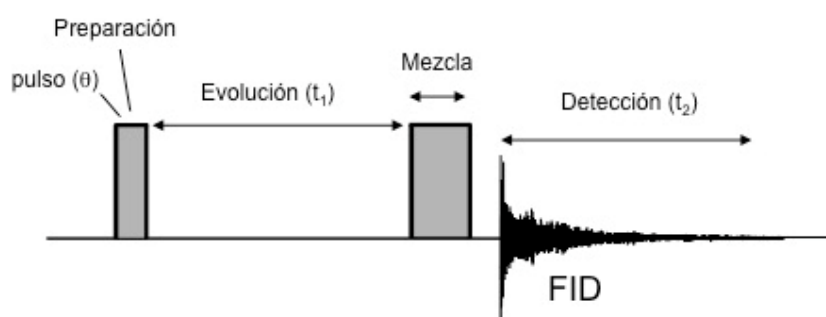


Figura I.8. Diferentes etapas de las que consta un experimento 2D de RMN.

Los componentes básicos de un espectrómetro de RMN incluyen un imán superconductor, que genera un campo magnético constante con una intensidad situada habitualmente entre 300 y 800 MHz, si bien existen equipos que disponen de campos magnéticos más intensos (hasta 1 GHz), bajo cuya acción la muestra se introduce, un emisor de frecuencias de radio, una sonda o bobina transmisora/receptora de frecuencias de radio y un sistema de recepción conectado a una estación de procesamiento y almacenamiento (Figura I.9).

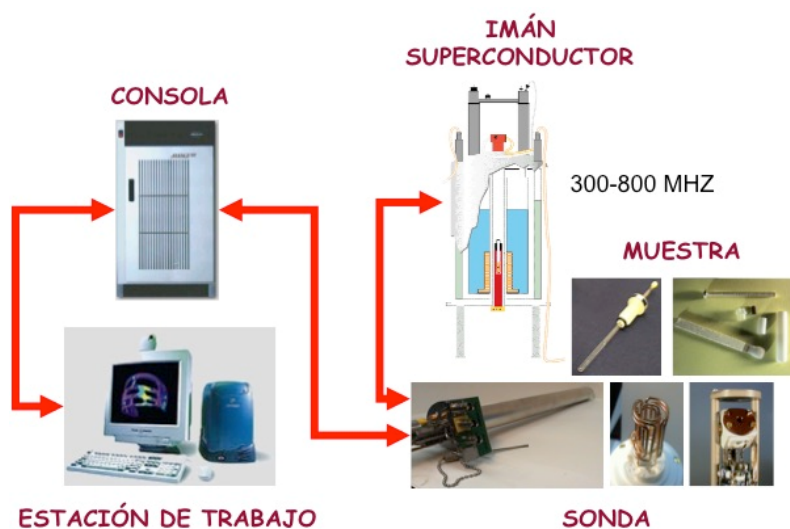


Figura I.9. Esquema básico de los componentes de un espectrómetro de RMN.

En función del tipo de muestra a estudiar, líquida, sólida o semisólida, se utilizan diferentes recipientes para el análisis (tubo, rotor) en donde se sitúa la muestra. La intensidad del imán superconductor empleado, el tipo de sonda y la

metodología empleadas también poseen diferencias significativas, algunas de las cuales se comentarán más adelante.

I.2.3. Metodologías de RMN en análisis de alimentos.

Las diferentes modalidades de la RMN se pueden aplicar a una amplia variedad de muestras en diferentes estados físicos (sólido, líquido, semisólido). En esta tesis nos centraremos en la aplicación de la espectroscopía de RMN de bajo y alto campo al estudio de diferentes muestras alimentarias en estado líquido y semisólido. Otras modalidades de la RMN como la *Relaxometría* (RMN de bajo campo), la *RMN de estado sólido*, la *imagen de resonancia magnética* (IRM), el *análisis de la fracción isotópica* (*Site-Specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance*, SNIF-NMR) e incluso la espectroscopía de REE también se han aplicado con éxito en el análisis de alimentos.²⁵ Aunque estas otras modalidades no constituyen el objeto de la presente Tesis, con vistas a proporcionar una visión general de sus posibilidades para el análisis de muestras alimentarias, se ha optado por exponer brevemente sus fundamentos y alguna de sus aplicaciones más ilustrativas en este campo.

I.2.3.1. Espectroscopía de RMN.

I.2.3.1.1. Elucidación estructural y análisis.

Un espectro 1D de RMN cubre el rango de frecuencias de los núcleos que están siendo observados. Estudiando detalladamente las propiedades de las señales de resonancia es posible conocer características intrínsecas de la naturaleza química de las moléculas en estudio, como por ejemplo: la posición en el espectro (*desplazamientos químicos*) que es determinada por el entorno químico del núcleo, lo que proporciona información de los alrededores químicos existentes. Los *desdoblamientos o estructura fina* de las señales son el producto de la interacción con los núcleos vecinos que posean momento magnético. Estos acoplamientos espín-espín pueden tener lugar entre núcleos del mismo tipo (homonucleares) o entre núcleos de elementos diferentes (heteronucleares). Existen dos tipos de acoplamientos: *escalares*, que se producen a través de los enlaces (su valor en Hz se denomina *constante de*

²⁵ Marcone, M. F.; Wang, S.; Albabish, W.; Nie, S.; Somnarain, D.; Hill, A. *Food Res. Int.* **2013**, 51, 729-747.

acoplamiento, $J_{A,X}$) y *dipolares*, que se establecen a través del espacio. Ambos tipos de acoplamientos ofrecen información sobre los enlaces químicos, la hibridación de los átomos, las longitudes y los ángulos de enlace, los ángulos torsionales, los tipos de sustituyentes que posea la molécula o la presencia de pares de electrones no compartidos y constituyen por tanto una valiosa información sobre la estructura molecular.

Adicionalmente, el área que comprende cada señal (*integral*) es proporcional a la abundancia relativa de los núcleos que la producen y por tanto, aporta datos acerca de la concentración. La *anchura de línea* proporciona información sobre otras características estructurales como los tiempos de relajación T_1 (*tiempo de relajación longitudinal*) y T_2 (*tiempo de relajación transversal*), que están relacionados con el comportamiento dinámico de los sistemas estudiados.^{26,27}

La información que contiene un espectro de RMN es bastante completa, lo que permite con frecuencia la elucidación de manera directa de la estructura de determinadas moléculas sencillas y/o de tamaño intermedio, tal como se observa en la Figura I.10 para el espectro de ^1H -RMN de la molécula de la quinina.

Espectro ^1H de la Quinina

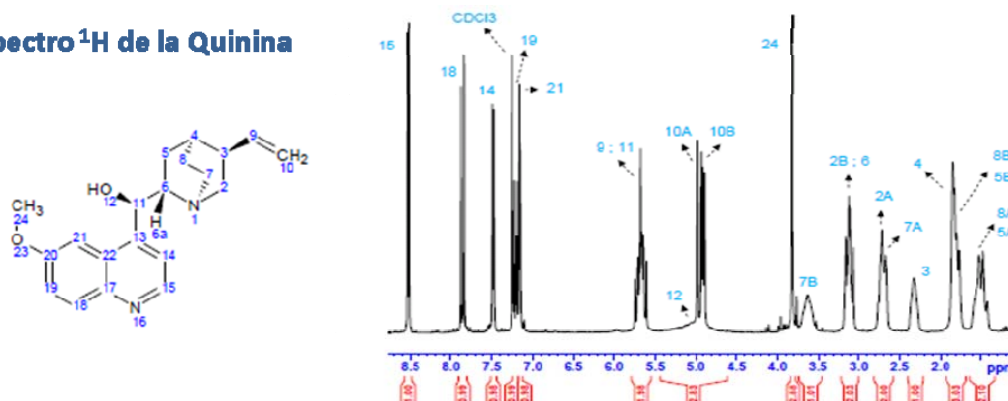


Figura I.10. La quinina es un alcaloide natural con actividad antimalárica que se utiliza con frecuencia como muestra patrón en los laboratorios de RMN. A la derecha se observa parte de su espectro de ^1H -RMN, que permite elucidar su estructura de manera directa.

Sin embargo también es frecuente obtener espectros 1D en los que, dada la concentración masiva de señales, es muy difícil extraer la información, que es

²⁶ Günther, H., *NMR Spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim 2013.

²⁷ Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., versión española: Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Söllhuber, M., *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Síntesis S.A., Madrid, 2005.

lo que ocurre generalmente en las muestras de alimentos. Este fenómeno se va haciendo más acusado a medida que aumenta el tamaño y la complejidad de los sistemas estudiados, como se aprecia en el espectro de ^1H -RMN de la flavodoxina, mostrado en la Figura I.11.

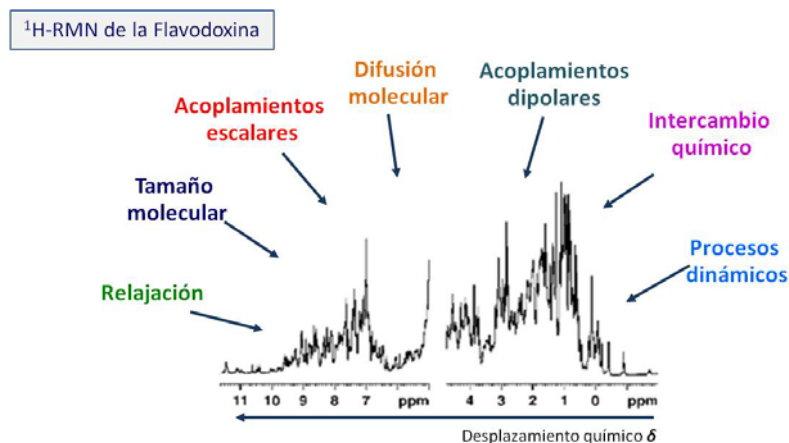


Figura I.11. Espectro de ^1H -RMN de la proteína bacteriana flavodoxina. En él se aprecia una gran complejidad, la cual se debe a diferentes factores como los que se señalan en el esquema.

La RMN 2D nace como consecuencia de la necesidad de resolver el problema de la falta de resolución espectral en los experimentos monodimensionales complejos. Consiste básicamente en el reagrupamiento ordenado de los datos de RMN en dos dimensiones, simplificando sustancialmente su apariencia y características.

En la RMN 2D, los datos adquiridos dependen de dos variables de tiempo diferentes. La primera continúa siendo el tiempo t_2 , que es el *tiempo de detección* habitual en los experimentos de RMN 1D. La segunda es una nueva variable temporal t_1 , denominada *tiempo de evolución*. Los experimentos de RMN 2D se basan por tanto en la adquisición de experimentos sucesivos de RMN 1D, en los que t_1 es incrementado de manera secuencial en cada uno de ellos. De esta manera, la FID obtenida dependerá de dos variables temporales $f(t_1, t_2)$, que tras la aplicación de la transformada de Fourier dará lugar a un espectro bidimensional en función de dos variables en el dominio de las frecuencias, $f(\nu_1, \nu_2)$.

El esquema general de un experimento de RMN 2D se muestra en la Figura I.12. Consta de cuatro etapas diferentes: la primera de ellas es la denominada de *Preparación*, durante la cual se aplican uno o varios pulsos de

radiofrecuencias para la excitación. La siguiente etapa constituye el denominado periodo de *Evolución*, en el que se introduce la variación en función del tiempo t_1 . La tercera etapa es conocida como periodo de *Mezcla* y determina la información que contendrá el espectro final. Por último se encuentra la etapa de *Detección*.

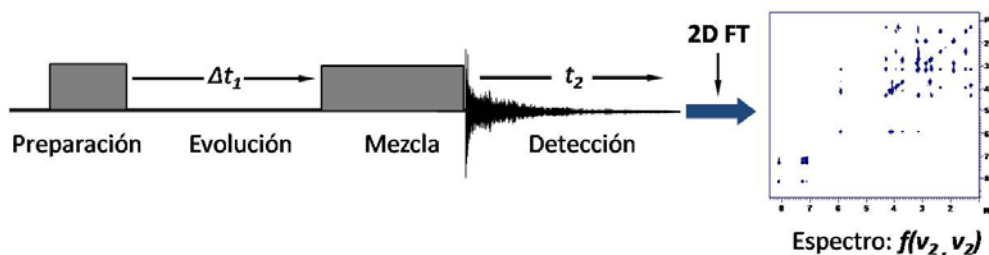


Figura I.12. Esquema general de un experimento de RMN 2D. Tras las etapas de preparación, evolución (t_1) y mezcla, se adquiere la señal (t_2) de manera análoga al experimento RMN 1D. La secuencia se repite cada vez con un incremento secuencial en el valor de t_1 . Tras la doble transformada de Fourier de los datos obtenidos, se obtiene un espectro 2D $f(\nu_1, \nu_2)$.

Esta sucesión de eventos mostrada en la Figura I.12, es lo que se conoce como *secuencia de pulsos*. La naturaleza exacta del periodo de mezcla es lo que determina la información que se va a obtener en el espectro 2D. Por ello, existe un gran número de secuencias de pulsos diferentes. Así, existen secuencias de pulsos de *RMN 2D homonucleares*, en donde las dos dimensiones corresponden al mismo núcleo, pero también se pueden utilizar dos canales de radiofrecuencia simultáneos, cada uno trabajando a la frecuencia de resonancia de un núcleo diferente y estaremos entonces hablando de un experimento de *RMN 2D heteronuclear*. Dependiendo del tipo de muestra a estudiar y de la información que se desee obtener, se habrán de aplicar las secuencias de pulsos adecuadas, que habitualmente se encuentran en la librería de experimentos de los espectrómetros de RMN. A continuación se indican las principales secuencias de pulsos bidimensionales (2D) que se utilizan en el estudio de muestras alimentarias:

Los más importantes experimentos de RMN 2D homonucleares utilizados en el análisis de los productos alimentarios son.^{28,29}

²⁸ Le Guennec, A.; Giraudeau, P.; Caldarelli, S. *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 5946-5954.

²⁹ Zerbe, O.; Jurt, S. *Applied NMR Spectroscopy for Chemists and Life Scientist*. Wiley, Weinheim 2014.

- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (*CORrelated SpectroscopY*). Proporcionan una valiosa información sobre los acoplamientos escalares ^1H - ^1H (geminales y vecinales). Establece principalmente, las relaciones de vecindad entre los núcleos de hidrógeno de la molécula (situados a 3 enlaces).
- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY (*Total CORrelated SpectroscopY*). Proporciona información más completa que la de los experimentos $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, ya que reflejan los acoplamientos entre núcleos de ^1H , pertenecientes al mismo sistema de espines, que se encuentran a una distancia entre 2 y 5 enlaces entre ellos. Se consigue así disponer de una información bastante completa sobre la vecindad de núcleos de ^1H . Cada una de las señales de cruce obtenidas en el espectro 2D correlacionan a los núcleos de ^1H , que se encuentran acoplados entre sí a través de los enlaces (correlación escalar).

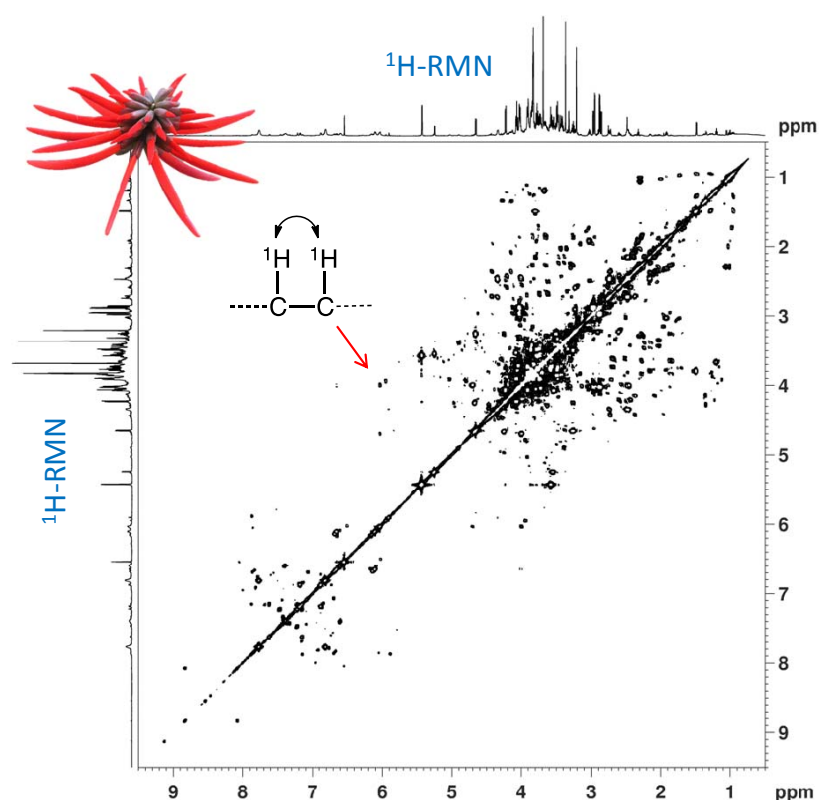


Figura I.13. Ejemplo de espectro bidimensional $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY del extracto acuoso de la flor mejicana “colorín” (*Erythrina coralloides*) adquirido en un espectrómetro de 700 MHz. El estudio estructural llevado a cabo permitió confirmar la presencia de antocianinas y flavonoides, compuestos que poseen un conocido efecto beneficioso para la salud, lo que abre la posibilidad de que sean utilizados como ingredientes funcionales.³⁰

³⁰ Sánchez-Mendoza, J.; Castejón, D., E.; Márquez, O.; Cambero M. I. 2013. Análisis Nutricional y Caracterización por RMN del Extracto Acuoso de los Pétalos de *Erythrina Coralloides*. ACOFESAL 2013. II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria, Madrid.

- ^1H , ^1H -NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Permite la determinación de la proximidad espacial entre los núcleos de ^1H . Las señales de cruce o correlaciones que aparecen en este experimento bidimensional reflejan la existencia de interacciones a través del espacio (acoplamientos dipolares) entre los núcleos de ^1H . Para que esta interacción se pueda detectar, la distancia internuclear ha de ser igual o inferior a 5 Å.
- 2D J -resueltos. En este tipo de experimentos los acoplamientos escalares (J) se representan en la primera dimensión y los desplazamientos químicos (δ) en la segunda. Se obtiene un espectro completamente desacoplado donde cada señal de resonancia queda reflejada mediante un singlete. Por ello este experimento es especialmente interesante en el estudio de muestras complejas que presentan habitualmente numerosos multipletes con grandes solapamientos.³¹

Por otro lado, al analizar cualquier tipo de muestra, además del núcleo de ^1H , existen otros núcleos de interés (heteronúcleos) que se pueden observar como son el ^{13}C , el ^{15}N o el ^{31}P . Adicionalmente, también se pueden analizar otros núcleos tales como ^{11}B o ^{19}F , que también son importantes en algunos estudios más específicos. Debido a su baja sensibilidad, los heteronúcleos presentan con frecuencia problemas de detección para su *observación directa* en el espectrómetro. En estos casos se aborda su estudio a través de la *detección inversa*, registrando la intensidad de núcleos sensibles, p.e. las de ^1H , acoplados con ellos. Se obtiene así una información indirecta, esencial en núcleos tan importantes como poco sensibles como el ^{13}C . Se utilizan para ello experimentos 2D de detección inversa (^1H -X). Los experimentos de RMN 2D de correlación heteronuclear más habituales son:³²

- ^1H ,X-HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) o ^1H ,X-HMQC (*Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*), que muestran las correlaciones escalares entre los núcleos de hidrógeno y los heteronúcleos a los que se encuentran directamente unidos.

³¹ Khatib, A.; Wilson, E. G.; Kim, H. K.; Lefeber, A. W.; Erkelens, C.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 559, 264-270.

³² Findeisen, M.; Berger, S. *50 and More Essential NMR Experiments*. Wiley, Weinheim 2014.

Estructuralmente, se trata, quizás, del espectro que mayor información proporciona. Como ejemplo, en la Figura I.14 se muestra el espectro bidimensional ^1H , ^{13}C -HSQC de la fracción insaponificable de un aceite de oliva virgen extra variedad cornicabra. La elucidación estructural llevada a cabo permitió diferenciar entre variedades y calidades de aceite de oliva.³³

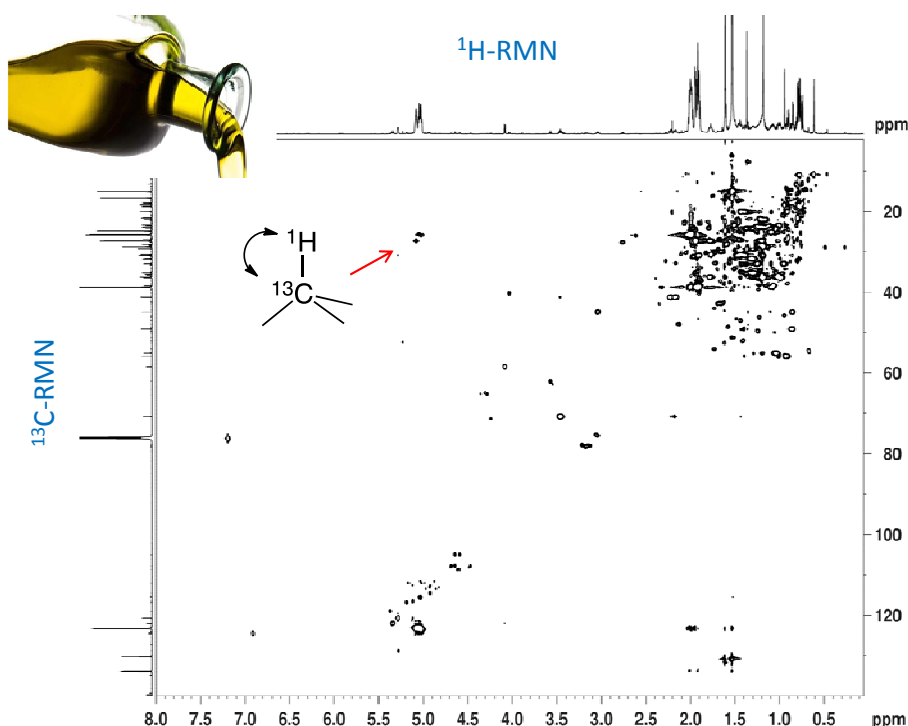


Figura I.14. Espectro ^1H , ^{13}C -HSQC de la fracción insaponificable de un aceite de oliva virgen extra variedad cornicabra adquirido en un espectrómetro de 700 MHz equipado con criosonda.

- ^1H ,X-HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*), que proporcionan las correlaciones entre los núcleos de hidrógeno y los heteronúcleos X con los que se acoplan escalarmenete a dos o tres enlaces de distancia.

I.2.3.1.2. Esquemas adicionales de adquisición.

El análisis por RMN de ciertos tipos de muestra puede requerir el empleo de esquemas de adquisición específicos. Quizás uno de los más importantes por lo habitual de su utilización, lo constituya la adquisición de espectros en los que

³³ Trabajos de fin de grado del Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid. Juan Gómez Pagan, *Estudio de la fracción insaponificable en muestras de aceite de oliva mediante RMN*, junio 2012 y Roberto Fuentes García, *Estudio y comparación de la fracción insaponificable en muestras de aceite de oliva de distintas variedades mediante RMN*, junio 2013.

se ha llevado a cabo la *supresión de la señal del disolvente*, que frecuentemente se trata de la *supresión del agua*. En disoluciones acuosas, la señal del disolvente llega a ser hasta cuatro órdenes de magnitud superior a la de los solutos que se pretenden analizar (concentración mM de los solutos frente a concentración 90-110 M de los protones del H₂O). Por tanto, para el análisis de matrices alimentarias íntegras (no extractos), resulta esencial una buena supresión de la señal del agua. Además, puede haber casos, como el de las bebidas alcohólicas, donde sea necesario suprimir más de una señal intensa, como la señal del agua y la del etanol.³⁴ Para estos casos, existen diferentes esquemas de supresión múltiple de señales como puedan ser la clásica irradiación de las señales (*presaturación*), los denominados *Watergate* y *Excitation Esculpting*, basados en la aplicación de pulsos combinados con gradientes de campo, o el denominado WET (*Water suppression Enhanced through T₁ effects*), que son esenciales para la solución y/o la reducción del problema. Quizás sea la secuencia NOESY-1D una de las más frecuentemente empleadas en Metabonomía.³⁵ Las características de los distintos métodos que se utilizan en la actualidad se pueden encontrar en recientes revisiones bibliográficas.^{36,37,38}

Un problema habitual en el análisis de muestras biológicas mediante RMN estriba en la probable gran diferencia de contenido de los componentes presentes y por tanto en la intensidad de sus señales. La capacidad de un espectrómetro para la detección de señales poco intensas en presencia de señales de gran intensidad, depende del *rango dinámico* del sistema de detección. Este rango dinámico depende a su vez del número de bits disponibles en el digitalizador (*convertidor analógico digital*) del equipo. La Figura I.15 muestra una comparativa de espectros de ¹H-RMN adquiridos sin y con esquema de presaturación de señales. Como se muestra en los espectros de la figura, sólo se consiguen observar los metabolitos de interés después de saturar la señal del agua.

³⁴ Monakhova, Y. B.; Mushtakova, S. P.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W. *Magn. Reson. Chem.* **2014**, *52*, 755-759.

³⁵ McKay, R.T Concepts in Magnetic Resonance, Part A: Bridging Education and Research, **2011**, 38A, 197-220.

³⁶ Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH, Weinheim 2004.

³⁷ Zheng, G.; Stait-Gardner, T.; Kumar, P. A.; Torres, A. M.; Price, W. S. *J. Magn. Reson.* **2008**, *191*, 159-163.

³⁸ Giraudeau, P.; Silvestre, V.; Akoka, S. *Metabolomics* **2015**, *11*, 1041-1055.

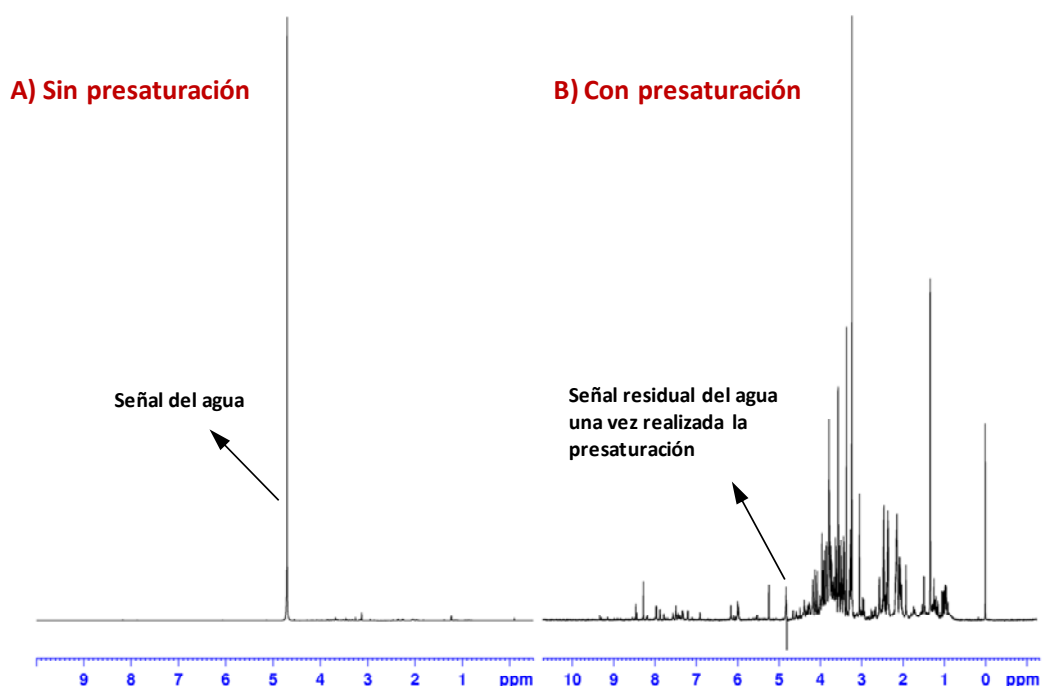


Figura I.15. Espectro de ^1H -RMN de extractos celulares adquiridos en un espectrómetro de 700 MHz. El espectro de la izquierda fue adquirido sin presaturación de la señal del agua y el de la derecha aplicando una secuencia de pulsos que incluye presaturación, *noesypr1d*.

También se pueden utilizar otros esquemas específicos, bien para *editar* los espectros de RMN, como los de ^{13}C -RMN, modificando la intensidad y la fase de las señales, bien para *eliminar* las señales de RMN procedentes de compuestos de bajo o de alto peso molecular. Por lo general, la eliminación de las señales procedentes de compuestos de bajo peso molecular se consigue empleando *filtros de difusión*, mientras que para eliminar las de los segundos son necesarios *filtros de relajación (espín-espín o T_2)*. Los filtros de difusión se basan en secuencias de eco de espín en las que se aplican pulsos de gradiente de campo magnético. Los compuestos de bajo peso molecular se difunden rápidamente por lo que la intensidad de sus señales decae asimismo con rapidez. Dependiendo de la diferencia en la movilidad molecular de los compuestos analizados, una elección adecuada de los parámetros experimentales puede dar lugar a la cancelación total de las señales de RMN debido a las especies que difunden rápidamente, y por lo tanto sólo las señales de resonancia debidas a los compuestos de alto peso molecular permanecerán en el espectro resultante. La Figura I.16 muestra un ejemplo de espectro ^1H -RMN de queso manchego sin y con filtro de difusión. Como se observa en el

espectro superior, todas las señales de bajo peso molecular correspondientes a los aminoácidos y los ácidos orgánicos, desaparecen al aplicar el filtro de difusión y únicamente permanecen en el espectro las señales correspondientes a los triglicéridos y los ácidos grasos que presentan un alto peso molecular.

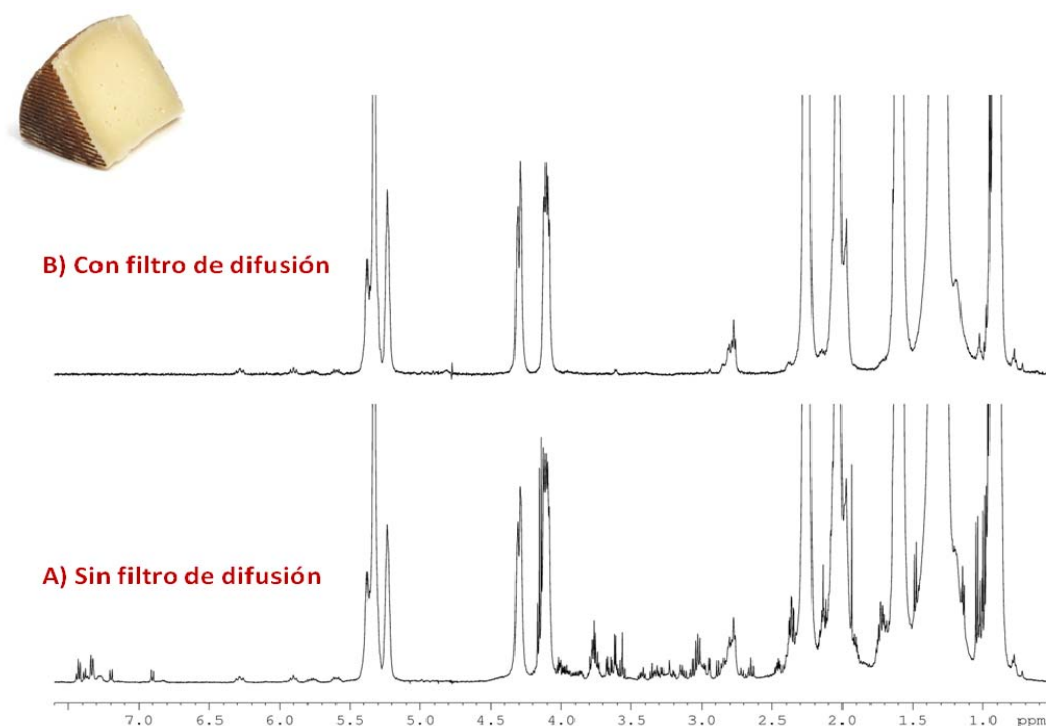


Figura I.16. Espectro de ^1H -RMN/HRMAS de queso manchego registrado a 500 MHz, adquirido con filtro de difusión (arriba) y sin filtro de difusión (abajo).

Una extensión de estos experimentos de RMN de filtrado por difusión es el experimento bidimensional denominado *DOSY* (*Diffusion Ordered Spectroscopy*). Introducido por Morris y Johnson,³⁹ esta técnica se basa en la adquisición de una serie de espectros de RMN 1D con un aumento progresivo de la atenuación generada por la difusión, que produce un aumento progresivo de la intensidad del gradiente de campo magnético aplicado. El conjunto de datos resultante da lugar a un pseudo espectro de RMN 2D, que muestra los desplazamientos químicos de RMN y los coeficientes de difusión en los ejes horizontal y vertical, respectivamente. La importancia del experimento DOSY en el análisis de alimentos ha sido explorado por Gil et al.,⁴⁰ que lo aplicó al estudio de zumos de frutas y de cerveza. En ellos se puso de manifiesto cómo la

³⁹ Morris, K. F.; Johnson Jr, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139-3141.

⁴⁰ Gil, A.; Duarte, I.; Cabrita, E.; Goodfellow, B.; Spraul, M.; Kerssebaum, R. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *506*, 215-223.

capacidad de difusión de los diferentes componentes presentes en un alimento, representan una ayuda complementaria a la asignación espectral y por ende, a la elucidación estructural.

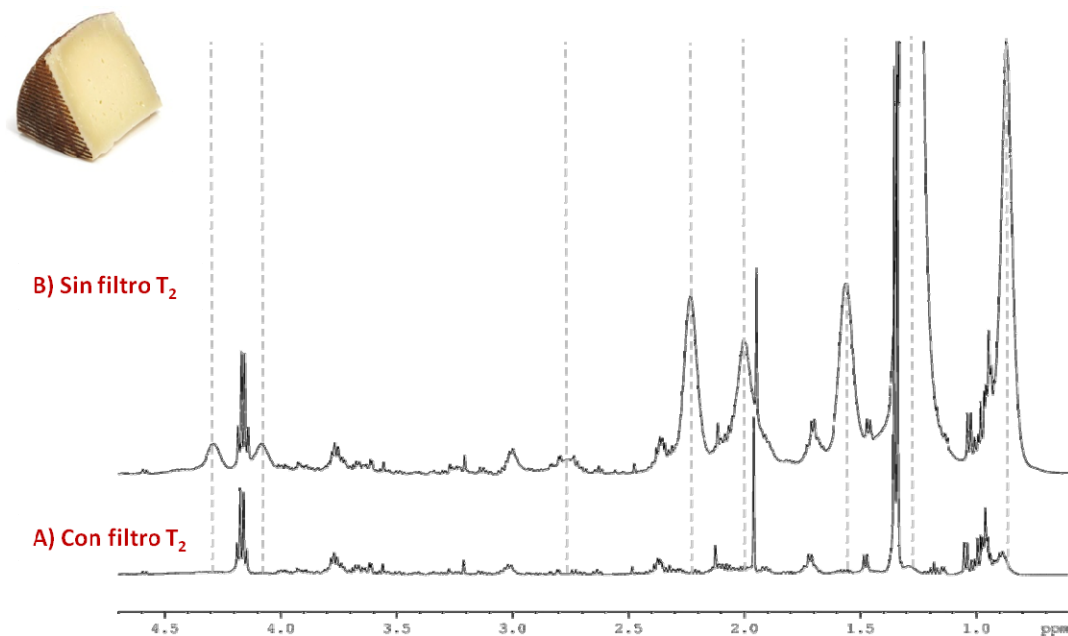


Figura I.17. Espectro de ^1H -RMN registrado a 500 MHz, de queso manchego sin (arriba) y con (abajo) filtro T_2 (CPMG) para la poder eliminar las anchas señales de los ácidos grasos y de los triglicéridos.

Los *filtros de relajación* se basan en la secuencia de pulsos *Carr Purcell Meiboon Gill* (CPMG), en la que se aplica un tren de pulsos de radiofrecuencia de 180° , separados por un tiempo de eco. Al aplicar un filtro de relajación CPMG, o filtro T_2 , las señales pertenecientes a todas las especies que se relajan con rapidez (señales de RMN anchas) se eliminan, mientras que las derivadas de especies con una relajación lenta (señales más estrechas, caracterizadas por valores de T_2 largos), pueden ser observadas. La Figura I.17 muestra un ejemplo de un espectro de ^1H -RMN de queso manchego registrado con y sin filtro T_2 .

SNIF-NMR (*Specific Natural Isotope Fractionation–Nuclear Magnetic Resonance*) se trata de una metodología que se fundamenta en la correlación existente en la relación isotópica entre deuterio e hidrógeno ($^2\text{H}/^1\text{H}$) de la materia de origen natural. Así, una de las primeras aplicaciones de esta metodología en el mundo de los alimentos fue la determinación geográfica del

origen del vino, aprobada por la UE en 1990,⁴¹ basada en que la concentración relativa de deuterio (^2H) es dependiente del lugar geográfico del cultivo de la vid. También ha sido aplicado con buenos resultados a bebidas alcohólicas, zumos de frutas, aromas y perfumes, aceites y grasas, leche y medicamentos. En la actualidad, SNIF-NMR es el método oficial de la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) y la Comisión Europea para el control de *chaptalización* del vino, práctica que consiste en añadir azúcar a la fermentación del mosto de uva durante la producción del vino para aumentar así el contenido final de alcohol. En la actualidad es asimismo un método oficial de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para detectar la adición de azúcar en zumos de fruta y para autenticar el origen natural de la vainilla.⁴² En la Figura I.18 se muestra un ejemplo de la metodología SNIF-NMR, que permite la diferenciación del etanol procedente de la azúcar de la uva y del derivado de la adición fraudulenta de azúcar de remolacha. En ella aparecen las diferentes señales del espectro de ^2H -RMN pertenecientes a los isómeros isotópicos que presentan núcleos de D en diferentes posiciones (*isotopómeros*) del etanol de uva y del etanol procedente del azúcar de remolacha.⁴³

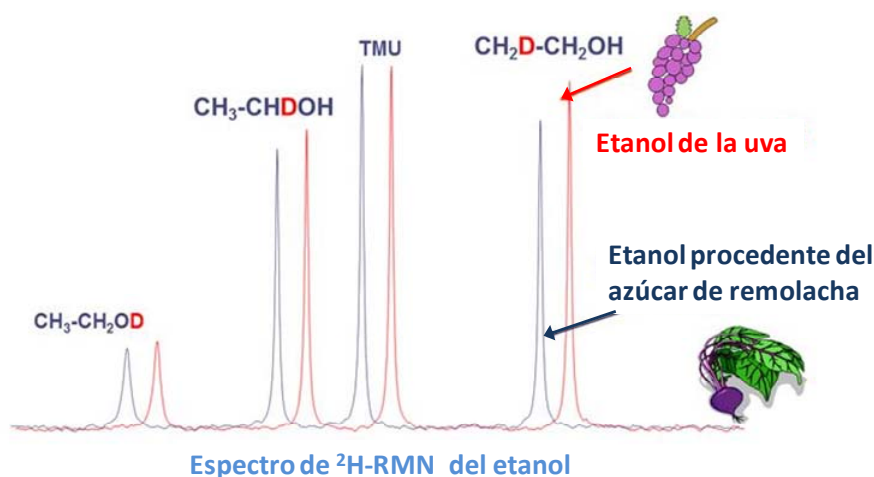


Figura I.18. SNIF-NMR es el método oficial de la OIV para determinar la autenticación del origen de los vinos.

⁴¹ Martin, G.; Martin, M. *The site-specific natural isotope fractionation-NMR method applied to the study of wines*. Wine Analysis. pp 258-275. Springer, Heidelberg 1988.

⁴² Greule, M.; Mosandl, A.; Hamilton, J. T.; Keppler, F. *Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 5305-5306.

⁴³ Martin, G. G.; Wood, R.; Martin, G. J. *J. AOAC Int.* **1996**, 79, 917-928.

I.2.3.1.3. Análisis de muestras en disolución.

Ésta es la modalidad de la RMN más convencional. Se puede aplicar a cualquier tipo de muestra e incluye el estudio de:

- ❖ *Muestras líquidas.* Se incluyen aquí muestras alimentarias líquidas que se analizan, bien sin ningún pretratamiento (p. ej., los zumos de frutas, el vinagre o los aceites vegetales), o bien con pretratamientos simples, como pueda ser la desgasificación de bebidas gaseosas (p. ej., la cerveza), o la liofilización y posterior redisolución del liofilizado, en el caso de requerir la concentración previa de la muestra (p. ej., el análisis del vino), o simplemente la disolución de la muestra, en el caso de que ésta sea viscosa (p. ej., la miel).
- ❖ *Muestras sólidas.* En este grupo se incluyen, básicamente, muestras de naturaleza tisular, cuyo análisis como muestra en disolución, requerirá obviamente un paso previo de extracción de los compuestos tisulares. El análisis de estas muestras sólidas generalmente lleva asociado un paso previo de homogeneización anterior a la extracción. El procedimiento de extracción es probablemente el paso más crítico, pues está destinado a la transferencia cuantitativa de los metabolitos de la matriz sólida a la disolución. Los productos alimentarios contienen una amplia variedad de compuestos con polaridades totalmente diferentes, por lo que se puede hablar de un método de extracción único que sea capaz de extraer todos los metabolitos en una única operación. Existen excelentes trabajos de revisión que compendian y detallan los diferentes métodos de extracción ya establecidos tanto para muestras y tejidos procedentes del mundo vegetal,^{44,45} como para la extracción de metabolitos de muestras de origen animal.^{46,47}

La Figura I.19 muestra una representación esquemática de los diferentes pasos que engloba el proceso de análisis por RMN de líquidos de muestras alimentarias tanto de origen animal como vegetal.

⁴⁴ Kaiser, K. A.; Barding, G. A.; Larive, C. K. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47, S147-S156.

⁴⁵ Kim, H. K.; Verpoorte, R. *Phytochem. Anal.* **2010**, 21, 4-13.

⁴⁶ Wu, H.; Southam, A. D.; Hines, A.; Viant, M. R. *Anal. Biochem.* **2008**, 372, 204-212.

⁴⁷ Lin, C. Y.; Wu, H.; Tjeerdema, R. S.; Viant, M. R. *Metabolomics* **2007**, 3, 55-67.

En la preparación de la muestra hay adicionalmente algunos aspectos que son importantes a fin de obtener resultados reproducibles y sin variaciones indeseables entre las muestras analizadas, que pueden dificultar la asignación de las señales de RMN y la comparación entre diferentes espectros. Seguidamente se mencionan:

- ❖ La *variación de pH* entre las muestras acuosas puede causar una significativa diferencia en los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes a los ácidos orgánicos, aminoácidos y a otros metabolitos con grupos funcionales ácidos o básicos. Las variaciones en el desplazamiento químico introducen cambios adicionales que pueden distorsionar los resultados. Para evitar este problema se pueden aplicar dos diferentes estrategias: por un lado, el control del pH (disolución tampón o ajuste del pH) o la realización de un procesamiento específico de los datos. Para la estabilización del pH entre 6 y 7, se suele utilizar generalmente un tampón fosfato, mientras que para soluciones ácidas ($\text{pH} \approx 4$), se utiliza tampón oxalato. Ambos tampones no generan señal adicional alguna en el espectro de ^1H -RMN. Adicionalmente, el pH de un conjunto de muestras se puede ajustar a un determinado valor mediante la adición de pequeños volúmenes de ácido clorhídrico, o de hidróxido sódico. Estos métodos de control del pH no producen un aumento de la fuerza iónica que pueda afectar a la sensibilidad del análisis de RMN.

La segunda estrategia mencionada consiste en enmascarar la variación en los desplazamientos químicos inducida por el pH, mediante un procesamiento específico de los datos. Este puede consistir en la multiplicación de la FID (*apodización*) por una función exponencial con valores altos del parámetro lb (*line broadening*) (10 - 50 Hz). Esto se ha utilizado con éxito en el análisis de muestras de cerveza.⁴⁸ Otra alternativa la constituye la aplicación de un procedimiento de *bucketing*, que es una opción muy utilizada en el análisis multivariante de los datos, en la que los espectros se dividen en regiones espectrales cuidadosamente seleccionadas.⁴⁹

⁴⁸ Duarte, I. F.; Barros, A.; Almeida, C.; Spraul, M.; Gil, A. M. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 1031-1038.

⁴⁹ Weljie, A. M.; Newton, J.; Mercier, P.; Carlson, E.; Slupsky, C. M. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 4430-4442.

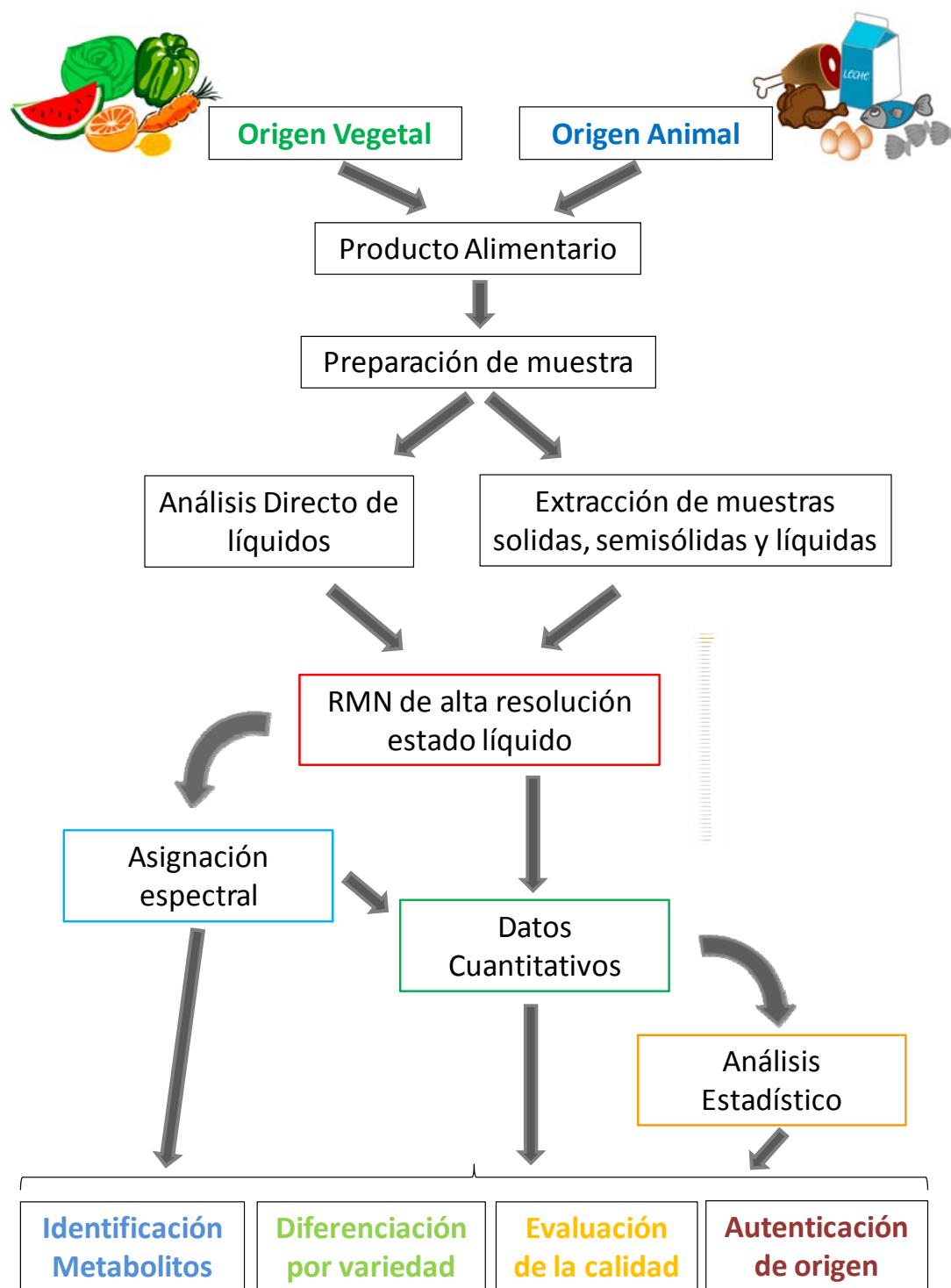


Figura I.19. Representación esquemática del análisis de muestras líquidas mediante RMN.

- ❖ *Disolvente deuterado.* La técnica de RMN en estado líquido requiere la presencia de un disolvente deuterado para corregir la variación en la frecuencia que se produce debido a la fluctuación del campo magnético. Además, sobre la señal del disolvente deuterado, se ajusta la homogeneidad del campo magnético y se obtienen así espectros con una alta resolución. Las muestras líquidas de alimentos pueden analizarse por RMN con la simple adición de una

pequeña fracción de disolvente deuterado para ajustar la señal de RMN. En el caso de muestras viscosas o sólidas, las muestras se disuelven directamente en el disolvente deuterado. Los disolventes deuterados comúnmente utilizados en el análisis de alimentos por RMN son D_2O , metanol- d_4 , dimetilsulfóxido- d_6 (DMSO- d_6), acetona- d_6 , acetonitrilo- d_3 y cloroformo- d . La elección del disolvente dependerá de la naturaleza de la muestra, su preparación y solubilidad. Para extractos polares generalmente se utilizan D_2O , metanol- d_4 o una mezcla de ambos (si los extractos alcohólicos secos se disuelven únicamente en D_2O , los componentes menos polares de la extracto podrían no disolverse). El cloroformo deuterado es el disolvente utilizado generalmente para los extractos apolares. Para poder utilizar los datos bibliográficos que han servido para asignar el espectro de un producto alimentario, habrá de tenerse siempre en cuenta la naturaleza del disolvente. De lo contrario, los desplazamientos químicos podrían ser diferentes, haciendo difícil la comparación. Por ejemplo, en el caso de vinagre, las asignaciones espectrales de 1H -RMN publicadas en la literatura en disolución tampón de D_2O y en DMSO- d_6 , muestran diferencias en los desplazamientos químicos de ciertas señales en función del disolvente utilizado.^{50,51}

La Figura I.20 refleja las operaciones necesarias y espectro de 1H -RMN resultante de un análisis metabólico realizado sobre una muestra de exudado de merluza.

- ❖ *Concentración y temperatura.* El efecto de la concentración sobre los desplazamientos químicos es otro aspecto que tiene que ser considerado en el análisis de los espectros de RMN y, en algunos casos, puede hacer que sea difícil la utilización de los valores de desplazamiento químico publicados, pertenecientes a los compuestos estándar de referencia para la identificación de los metabolitos presentes en una mezcla. Un ejemplo de la variación de los desplazamientos químicos con la concentración son el ácido cítrico y el ácido málico.⁵² Debido a lo anterior, con el fin de confirmar la presencia de un metabolito específico en el análisis de mezclas, es frecuente la adición (*dopado*)

⁵⁰ Caligiani, A.; Acquotti, D.; Palla, G.; Bocchi, V. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 585, 110-119.

⁵¹ Consonni, R.; Gatti, A. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3446-3450.

⁵² Kim, H.; Choi, Y.; Verpoorte, R. *Metabolomic analysis of Catharanthus roseus using NMR and principal component analysis*. Plant Metabolomics; Springer: Berlin Heidelberg, **2006**; pp 261-276.

a la muestra del estándar correspondiente. Esta adición tiene que ser realizada usando una cantidad mínima, para evitar cambios drásticos de la composición de la mezcla que podrían dar lugar a variaciones de desplazamiento químico.

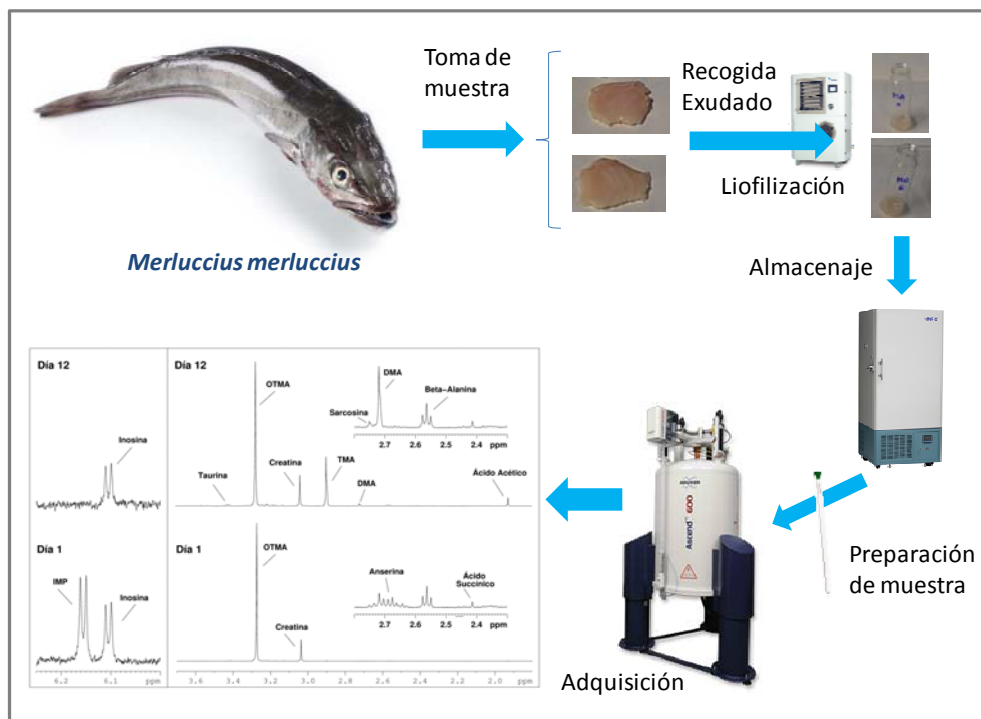


Figura I.20. Espectros de ^1H -RMN, registrados a 500 MHz. Muestra preparada a partir de exudado de merluza redisuelto en una disolución de tampón fosfato en D_2O .⁵³

Otro factor a tener en cuenta en el análisis de un conjunto de muestras es la temperatura a la que se realiza el análisis. Es importante que los experimentos de RMN se lleven a cabo a la misma temperatura para evitar posibles variaciones de desplazamiento químico. Como vimos con el pH o la concentración, el desplazamiento químico de ciertos compuestos es sensible a la temperatura. Un ejemplo es la señal del agua. Una correcta selección de la temperatura nos permitirá incluso evitar solapamientos innecesarios. Por ello es importante que siempre se indique la temperatura a la cual los experimentos fueron realizados.

- ❖ **Estándares Internos y agentes quelatantes.** En muchos casos, hay que recurrir a la adición de un patrón interno al disolvente deuterado utilizado. Este producto se utiliza fundamentalmente como referencia de desplazamiento químico, pero

⁵³ Castejón, D.; García-García, A. B.; Santos, C.; Escudero, R.; Romero de Ávila, M.D.; Herrera, A.; Cambero M. I. 2015. Análisis metabólico del exudado de merluza (*Merluccius merluccius*). Potencial como indicador de conservación del pescado. VIII CONGRESO CYTA / CESIA 2015. Badajóz.

su presencia también se puede aprovechar para obtener una cuantificación absoluta de los metabolitos presentes. En disoluciones acuosas se suele utilizar como estándar interno el 3-(trimetilsilil)propionato-2,2'-3,3'-sódico- d_4 (TSP) o el ácido 3,3 dimetil-2,2-silapentano-5-sulfónico (DSS), mientras que en muestras orgánicas el más utilizado es el tetrametilsilano (TMS). Debido a su alta volatilidad, este último estándar no es un patrón interno adecuado si lo que se quiere obtener es una cuantificación absoluta. Para ello se suele utilizar hexametildisilano (HMDS) como producto de referencia.

Las señales de RMN de algunos ácidos orgánicos (p. ej., el cítrico y el málico) procedentes de muestras de extractos derivados de plantas y productos alimentarios son generalmente anchas debido a que estos compuestos son capaces de formar complejos con cationes paramagnéticos (p. ej., con Fe^{3+} y Mn^{2+}). Este ensanchamiento de las señales de RMN se puede evitar mediante la adición a la muestra de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para capturar los iones paramagnéticos.

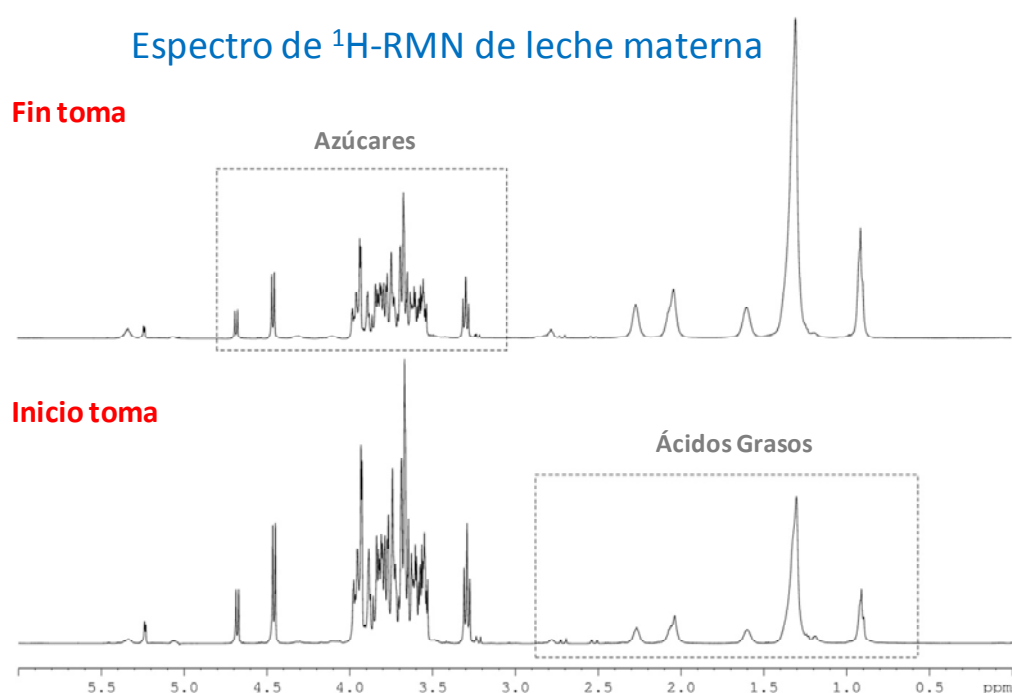


Figura I.21. Espectros de 1H -RMN de leche materna registrados a 500 MHz, realizados al inicio y al final de la toma de alimento. Muestra de 550 μL de leche materna en un tubo de RMN de 5 mm, con la única adición de 50 μL de una disolución de 0.1 mM de TSP (estándar interno) en D_2O .

Un sencillo análisis mediante ^1H -RMN es capaz de reflejar variaciones metabólicas importantes, como se pone de manifiesto en la Figura I.21 ante la evidente variación de la composición de azúcares y ácidos grasos cuyo contenido se invierte, como refleja el análisis de leche materna realizado al principio y al final de la toma.⁵⁴

I.2.3.1.4. Muestras Semisólidas.

La técnica que permite el estudio de muestras semisólidas por RMN es conocida como HRMAS por sus siglas en inglés *High Resolution Magic Angle Spinning* y utiliza metodología puesta a punto en el estudio de muestras sólidas mediante RMN. El empleo del giro con ángulo mágico ($\theta = 54.7^\circ$), combinado con la tecnología utilizada en las sondas de alta resolución de RMN de muestras líquidas, proporciona un medio fácil de obtener espectros de alta resolución de modelos heterogéneos que no son ni sólidos ni líquidos. La alta velocidad de giro de la muestra, típicamente 4-6 kHz, a la posición del ángulo mágico proporciona una reducción de los efectos de la anchura de línea típicos de muestras sólidas (causados por la heterogeneidad de la muestra y las interacciones anisotrópicas residuales). Tales efectos son normalmente promediados en muestras líquidas, donde las moléculas giran isotrópica y rápidamente.

La metodología de HRMAS permite analizar directamente, sin manipulación, una muestra o tejido/alimento intacto. Se consigue así la identificación simultánea de los metabolitos polares y apolares presentes y, por tanto, la caracterización completa de todo el contenido metabólico de un tejido/alimento intacto, evitando largos tiempos de manipulación y la posible alteración de la muestra.

En la Figura I.22 se muestra un esquema del giro de un rotor de HRMAS y el espectro de ^1H -RMN obtenido analizando una muestra de queso de oveja. La figura incluye la asignación de los principales compuestos presentes. En la ampliación se muestra la región aromática del espectro, que se corresponde mayoritariamente con los protones aromáticos de los aminoácidos.⁵⁵

⁵⁴ Castejón, D. Resultados no publicados.

⁵⁵ Castejón, D.; Villa, P.; Miralles, B.; Mengibar, M.; Herrera, A. *Alimentaria* **2008**, 395, 93-94.

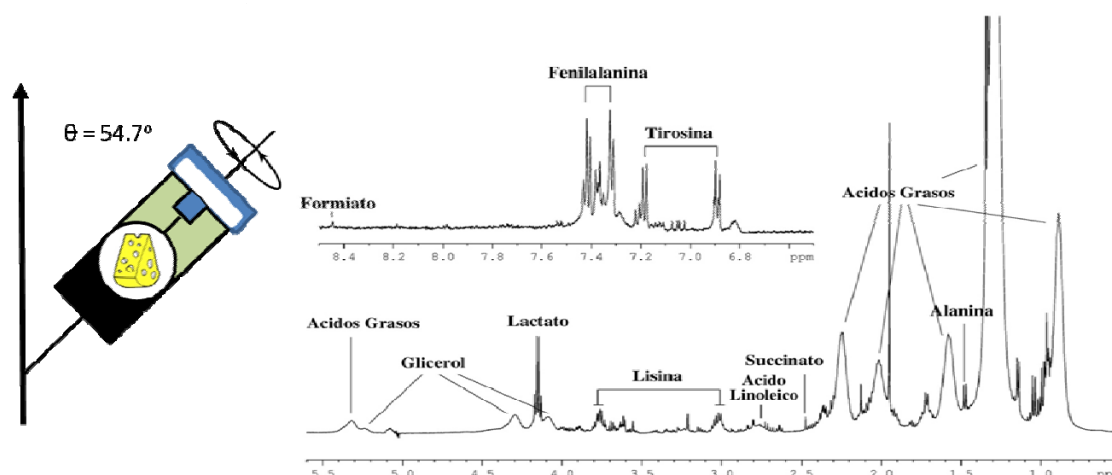


Figura I.22. Esquema de un rotor de HRMAS girando con ángulo mágico y espectro de ^1H -RMN/HRMAS correspondiente a una muestra de queso de oveja obtenido a 500 MHz.

I.2.3.1.5. Muestras sólidas.

En estado sólido la movilidad de los átomos y moléculas se encuentra muy restringida, por lo que, a diferencia de los espectros que se registran para moléculas en disolución, los espectros que se obtienen con muestras sólidas presentan señales ensanchadas que son el resultado de la suma de las señales procedentes de todas las posibles orientaciones espaciales de los espines. Dependiendo de la orientación relativa de las moléculas, cada núcleo podrá ser afectado no solo por el campo magnético externo, sino también por los campos magnéticos generados por los núcleos cercanos y por la distribución electrónica de sus alrededores. A pesar de todo, los espectros de RMN en fase sólida proporcionan una información única acerca de la estructura y la dinámica de los materiales objeto de estudio.

Las principales interacciones responsables del ensanchamiento de las señales son la anisotropía del desplazamiento químico, los acoplamientos dipolares (homo y heteronucleares) y el acoplamiento cuadrupolar. Se han desarrollado técnicas que reducen estas interacciones y permiten obtener espectros de alta resolución conservando en lo posible la información que aportan estas interacciones: giro con ángulo mágico, comentada en el apartado anterior (MAS, *Magic Angle Spinning*), polarización cruzada (CP, *Cross Polarization*) o secuencias multipulso específicas para sólidos (CRAMPS, *Combined Rotation and Multiple Pulse Spectroscopy*). La combinación de las técnicas CP y MAS de RMN en estado sólido (CPMAS) se ha utilizado tanto para

el control de la composición química de las muestras de alimentos tales como setas, semillas intactas,^{56,57} como para la caracterización de importantes componentes insolubles de los alimentos que incluyen almidón, celulosa, pectinas y proteínas.^{58,59}

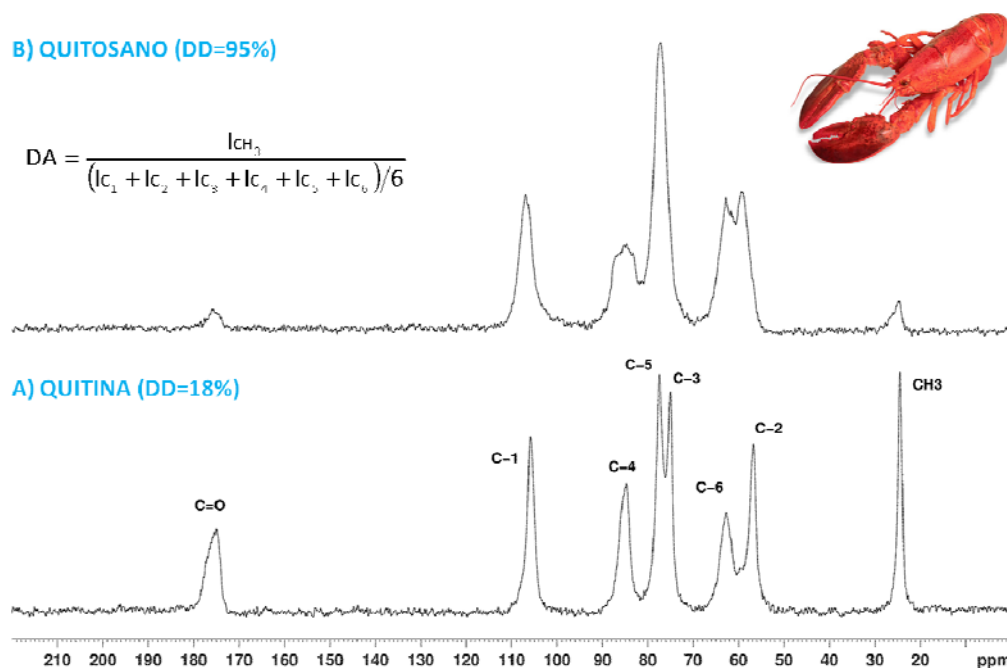


Figura I.23. Espectros de ^{13}C -RMN/CPMAS de A) α -Quitina y B) Quitosano registrados a 400 MHz.

El experimento CPMAS aplica la denominada polarización cruzada que permite transferir magnetización (aumento de intensidad) desde un núcleo abundante y receptivo (constante giromagnética alta) como el protón (^1H) a un heteronúcleo menos abundante y poco receptivo (constante giromagnética pequeña (p.e. ^{13}C)). La transferencia produce un incremento considerable de la sensibilidad del heteronúcleo. Como se mencionó anteriormente, el experimento se realiza mediante rotación con ángulo mágico (MAS) y desacoplamiento heteronuclear de protón. Estas condiciones permiten reducir el ensanchamiento de señales debido a efectos como la anisotropía de desplazamiento químico (CSA) y los acoplamientos dipolar y escalar ^1H -X. Un

⁵⁶ Bardet, M.; Foray, M. F.; Bourguignon, J.; Krajewski, P. *NMR. Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, 733-738.

⁵⁷ Pizzoferrato, L.; Manzi, P.; Bertocchi, F.; Fanelli, C.; Rotilio, G.; Paci, M. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5484-5488.

⁵⁸ Mutungi, C.; Passauer, L.; Onyango, C.; Jaros, D.; Rohm, H. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87, 598-606.

⁵⁹ Miura, K.; Nakano, T. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, 53, 189-195.

ejemplo de aplicación de la técnica CPMAS se muestra seguidamente a través de los espectros de ^{13}C -RMN de la quitina (A) y del quitosano (B) obtenidos a partir del caparazón de crustáceos (Figura I.23). El quitosano es un polisacárido que se produce mediante desacetilación de la quitina. Tanto la quitina como algunos quitosanos de bajo grado de desacetilación son insolubles y por tanto es necesario utilizar RMN en estado sólido. A partir de las señales de los carbonos C1 a C6 ($I_{\text{C-1}}$, $I_{\text{C-2}}$, $I_{\text{C-3}}$, $I_{\text{C-4}}$, $I_{\text{C-5}}$ y $I_{\text{C-6}}$) y de la del carbono del metilo (I_{CH_3}), se puede determinar el grado de acetilación (DA) o de desacetilación ($\% \text{DD} = 100 - \% \text{DA}$) del polisacárido estudiado mediante espectroscopía de ^{13}C -RMN.^{60,61}

I.2.3.2. Imagen de resonancia magnética (IRM).

La IRM se trata de una técnica en la que la señal de RMN es codificada espacialmente mediante el uso de gradientes de campo magnético, produciendo la dependencia espacial de los parámetros característicos de RMN de la muestra estudiada (p. ej., densidad protónica o tiempos de relajación), que pueden ser reconstruidas en un formato de imagen.⁶² La imagen de RMN consta de una matriz bidimensional de valores de intensidad (píxeles), que son la señal de pequeños volúmenes dentro de la muestra (*voxels*).⁶³ La señal de IRM es sensible a las propiedades inherentes de la muestra y a los ajustes experimentales. En una imagen, la intensidad de señal de cada pixel dependerá de la relajación longitudinal (T_1), de la relajación transversal (T_2) y de la densidad protónica (DP) de la muestra analizada, y por tanto de los principales parámetros experimentales de adquisición: tiempo de eco (TE) y el tiempo de repetición (TR). Pero además, como resultado de la agitación térmica, las moléculas presentan un movimiento de traslación al azar conocido como movimiento Browniano o de difusión molecular. Por ello, la IRM es sensible a la difusión molecular, que a diferencia del T_1 y T_2 , es independiente del valor de la intensidad del campo magnético. La IRM es la única técnica que permite la

⁶⁰ Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrieres, J.; Versali, M.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 746-751.

⁶¹ Galed Cerezuela, G. *Avances Biopolímeros quitina/quitosano: obtención, optimización y caracterización funcional*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2005.

⁶² Liang, Z.; Lauterbur, P. C. *Principles of magnetic resonance imaging*; SPIE Optical Engineering Press: New York, 2000.

⁶³ El anglicismo vóxel proviene de la composición entre los términos *VOL*ume y *píXEL*. Un vóxel es un elemento de volumen que contiene información gráfica asociada a un punto en un espacio tridimensional. Al igual que sucede con un píxel en un espacio con dos dimensiones, el vóxel es la mínima unidad de volumen que constituye un objeto en 3D.

visualización y el cálculo de la difusión molecular “*in vivo*”, directamente a partir de los movimientos moleculares de traslación del agua libre.⁶⁴ Por tanto, existen distintos tipos de imágenes de resonancia magnética según el fenómeno que domine en su formación. A estas adquisiciones diferenciadas se las denomina *potenciaciones* y se consiguen mediante la aplicación de distintos pulsos de radiofrecuencia, gradientes de campo magnético y la modificación de los parámetros de contraste para incrementar o ponderar un determinado efecto a fin de maximizar el contraste entre tejidos específicos (Ver Figura I.24). Las potenciaciones básicas son las siguientes:

- *Densidad Protónica*. La intensidad del píxel de la imagen resultante es proporcional a la concentración de núcleos de protón (^1H) del voxel.

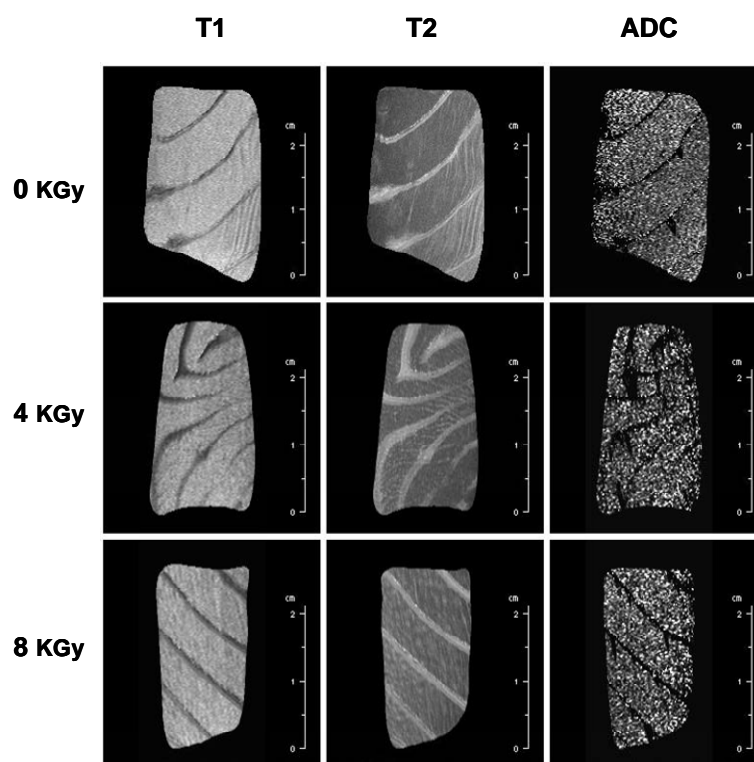


Figura I.24. Representación de los mapas de T_1 , T_2 y ADC obtenidos mediante IRM de muestras de salmón ahumado irradiadas a 0, 4 y 8 KGy. A partir de los mapas se pueden cuantificar los valores de T_1 , T_2 y los coeficientes de difusión aparente (ADC). El análisis del conjunto de valores obtenidos pone de manifiesto el potencial de la IRM para discernir entre muestras de salmón ahumado irradiadas y no irradiadas, así como para estimar la dosis de irradiación aplicada.⁶⁵

⁶⁴ Gili, J. *Introducción biofísica a la resonancia magnética*. Editado por Centre Diagnòstic Pedralbes. Barcelona 1993.

⁶⁵ Herrero, A. M., Castejón, D., Hoz, L., Ordóñez, J. A., Cambero, M. I. 2010. Imagen de Resonancia magnética nuclear de salmón ahumado tratado con electrones acelerados. CESIA-CIBSA 2010. VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Logroño.

- T_1 : Tiempo de relajación longitudinal. La intensidad del píxel de la imagen es inversamente proporcional al tiempo de relajación longitudinal propio de cada tejido.
- T_2 : Tiempo de relajación transversal. La intensidad del píxel de la imagen resultante es directamente proporcional al tiempo de relajación transversal propio de cada tejido.
- *Difusión*: La IRM es sensible a la Difusión Molecular que es consecuencia del movimiento de traslación de las moléculas por efecto de la agitación térmica. La intensidad del píxel de la imagen es inversamente proporcional al valor del coeficiente de difusión aparente.

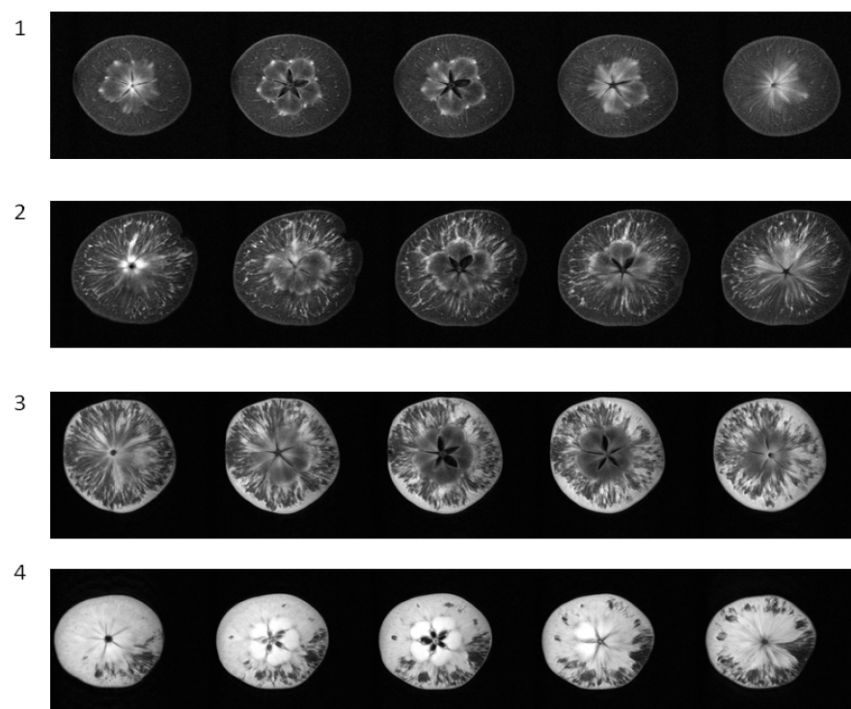


Figura 1.25. Cortes centrales de las imágenes de RM pertenecientes a los cuatro niveles de daño por vitrescencia en manzanas. 1. Manzana sana. 2. Vitrescencia leve. 3. Vitrescencia media. 4. Vitrescencia intensa.⁶⁶

En función de lo que se desea estudiar, se habrá de elegir aquel tipo de potenciación que permita obtener el contraste deseado. A partir de una serie de imágenes potenciadas en alguno de los parámetros mencionados anteriormente, se puede obtener el mapa a partir del cual se pueden extraer los valores del parámetro estudiado en aquellas regiones de interés (*ROIs*) que

⁶⁶ Melados Herreros, A. *Application of NMR techniques for the evaluation of fruit internal quality and physical properties of Food*, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, Mayo de 2014.

seleccionemos. A diferencia de las imágenes potenciadas, en los mapas, la intensidad de señal siempre es proporcional al parámetro estudiado. La IRM es una herramienta útil para obtener información estructural de las diferentes regiones de la muestra estudiada de forma no invasiva/destructiva. La IRM permite además la observación visual del interior de los alimentos lo que posibilita la monitorización del alimento estudiado y evaluar diferentes prácticas agrícolas (es decir, cosecha, postcosecha) o procesos industriales. Pero sobre todo, la IRM puede utilizarse para la clasificación y calidad de los alimentos en una línea de producción. Como se ve en el ejemplo de la Figura 1.25, la resonancia permite clasificar las manzanas en función del daño mediante *vitrescencia*.

1.2.3.3 Relaxometría.

La Relaxometría es una técnica que se centra en el estudio y medición de los tiempos de relajación característicos de la resonancia magnética. El contenido de agua es la principal fuente de variación en los tiempos de relajación y, generalmente, la velocidad de relajación transversal es una función lineal del contenido de agua libre, especialmente en alimentos con alto grado de humedad. Como las interacciones entre el agua y las macromoléculas determinan el movimiento del agua, las variaciones en la capacidad de las macromoléculas para unirse a las moléculas de agua se convierten en la segunda fuente de variación en los valores de los tiempos de relajación. Por lo tanto, la relación entre los procesos de relajación en resonancia y las propiedades moleculares del agua hace que sea posible extraer características del estado del agua (y por tanto información estructural) en los tejidos y alimentos mediante una cuidadosa interpretación de las curvas de relajación de la señal del agua. Una señal de resonancia magnética puede caracterizarse por tres propiedades:

- Su frecuencia de resonancia.
- Su relajación longitudinal o espín-red (T_1).
- Su relajación transversal o espín-espín (T_2).

De ellas, la frecuencia de resonancia es la que menor información proporciona con respecto a la señal del agua. Sin embargo, los tiempos de

relajación T_1 y T_2 se han utilizado en un gran número de estudios con matrices alimentarias a fin de extraer información estructural a través de los valores obtenidos de la señal del agua.⁶⁷ Se ha propuesto que la relajación de la mayoría de los tejidos/alimentos pueden ser descritos en función de tres poblaciones de agua: estructural, agua asociada estrechamente a las macromoléculas; aguas superficiales y el agua libre.⁶⁸ Cada fracción de agua se caracteriza por su propio tiempo de relajación. Estos tiempos de relajación T_2 característicos reflejan la movilidad del agua presente en esa población, como por ejemplo, las moléculas de agua muy móvil (libre), que relajarán muy lentamente, mientras que aquellas con un corto tiempo de relajación estarán asociadas a moléculas de agua con menor movilidad.

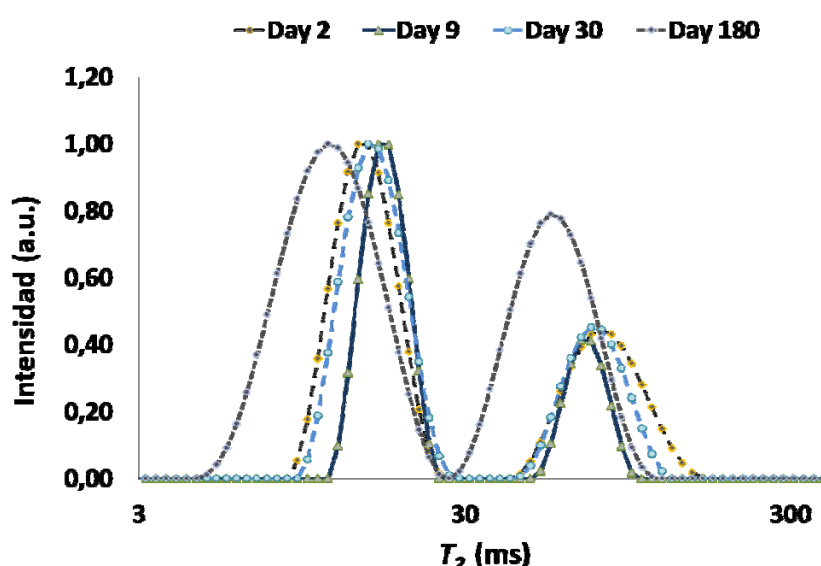


Figura I.26. Curvas de relaxometría registradas en un espectrómetro de 200 MHz, a partir de muestras obtenidas a diferentes tiempos de maduración durante el proceso de elaboración del queso manchego.

La *relaxometría* es un método rápido, no destructivo y altamente sensible a la movilidad a nivel molecular, con el que se puede obtener información macro y micromolecular de una matriz alimentaria a través del estudio de la movilidad y la distribución del agua. Además, es posible investigar cómo los diferentes parámetros de los procesos y componentes afectan a la disponibilidad del agua en los alimentos. Los valores de las curvas de relaxometría dependerán de la intensidad del campo magnético utilizado en el

⁶⁷ Melado-Herreros, A.; Fernández-Valle, M. E.; Barreiro, P. *Food Bioprocess Tech.* **2015**, 8, 88-99.

⁶⁸ Hills, B.; Manning, C.; Ridge, Y.; Brocklehurst, T. J. *Sci. Food Agric.* **1996**, 71, 185-194.

estudio, debido a la dependencia con el campo de los tiempos de relajación. Trabajar a bajo campo permitirá diferenciar poblaciones de agua con valores de tiempos de relajación más próximos y por tanto evaluar diferencias más sutiles frente a los estudios que se realicen a campos más altos, que permiten analizar la muestra completa sin manipulación alguna. En la Figura I.26 se muestran las curvas de relaxometría,⁶⁹ que representan los cambios de la componente T_{2a} (relajación rápida) y T_{2b} (relajación lenta), procedentes de muestras de queso manchego obtenidas tras diferentes tiempos de maduración.

I.2.3.4. Resonancia de Espín Electrónico (REE).

Los fundamentos físicos y los principios básicos de la *Resonancia de Espín Electrónico* (REE)⁷⁰ son similares a los de la RMN; sin embargo, mientras la RMN se centra en el estudio de núcleos, la técnica de REE lo hace sobre la interacción de la radiación electromagnética con los espines electrónicos. La otra gran diferencia entre RMN y REE es que la REE trabaja a una frecuencia fija y permite la variación de la intensidad del campo magnético, mientras que en la RMN sucede lo contrario.⁷¹

El electrón posee una carga neta y dispone de número cuántico de espín, por lo que será capaz de inducir un momento magnético. Bajo la acción de un campo magnético externo, el momento magnético del electrón tenderá a alinearse con la dirección del campo magnético aplicado. Esta es la base de la resonancia de espín electrónico. Con anterioridad se comentó que para que un núcleo pudiera ser estudiado mediante RMN, tenía que poseer un momento cuántico de espín nuclear $I \neq 0$. La condición para que una sustancia, matriz, etc. pueda ser analizada a través de REE, es que disponga de electrones desapareados. Como la mayoría de las moléculas estables poseen una configuración de capa completa, con todos los espines emparejados, la REE posee un ámbito de aplicación más reducido que la RMN. Como en RMN, cuando el sustrato a estudiar se sitúa bajo la influencia de un campo magnético, se produce el desdoblamiento de los niveles de energía. Si en estas condiciones,

⁶⁹ Cruz, K.; Fernández-Valle, M. E.; García-García, A. B.; Castejón, D.; Escudero, R. M.; Romero de Ávila, M. D.; Cambero, M. I. *Relaxometry and MRI study of Manchego cheese during ripening and its relationship with rheological behavior*. XII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance, 2014, Cesena, Italia.

⁷⁰ También denominada *Resonancia Paramagnética Electrónica* (RPE).

⁷¹ Rinard, G. A.; Quine, R. W.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R. *J. Magn. Reson.* **2002**, 156, 113-121.

se realiza un barrido de radiofrecuencias, generalmente en el rango de microondas, se producirá la absorción de la energía electromagnética y se adoptará un nivel de energía superior. Al igual que en RMN, al cesar la aplicación del pulso de excitación, los electrones excitados se relajarán para volver a su estado inferior de energía. Esta relajación, al igual que en la RMN, tiene dos componentes: la relajación espín-red, donde un electrón cede energía a su entorno y la relajación espín-espín, donde el electrón transmite energía a otro electrón.

La frecuencia de la energía absorbida por los electrones proporciona información acerca de la estructura química de la molécula a la que están unidos. Por ello, la REE se puede utilizar para determinar la composición química de diferentes materiales.

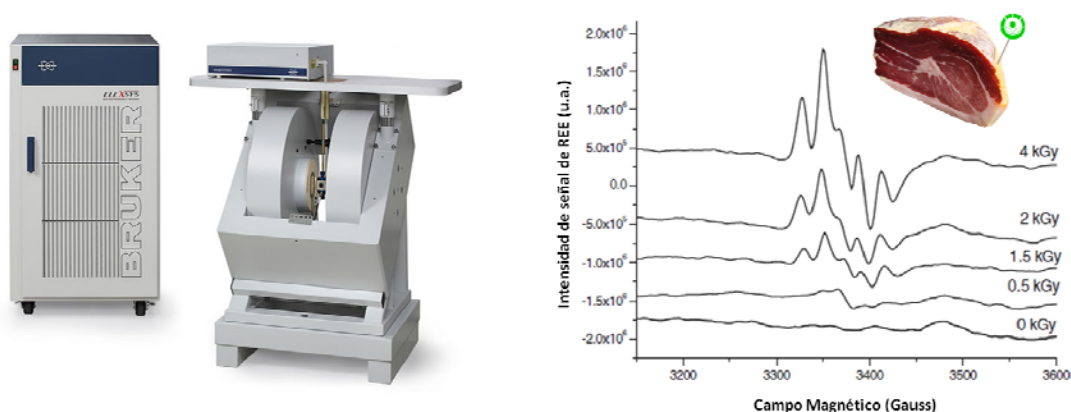


Figura 1.27. Espectros de resonancia de espín electrónico realizados en un equipo de onda continua y banda X (aproximadamente 9.5 GHz) con la fracción grasa de variedades seleccionadas de jamón ibérico después de un tratamiento con radiación beta (au: unidades arbitrarias).

En alimentos se ha llevado aún relativamente poca investigación acerca de la presencia y funciones de los radicales libres presentes en ellos, pero la REE es una técnica altamente específica y sensible para la detección directa de radicales libres y por ello, su aplicación a los alimentos puede revelar una información importante acerca de la presencia de estas especies, que pueden ser responsables de las cualidades y el deterioro de las matrices alimentarias.⁷² En relación a la posible formación de especies paramagnéticas asociadas al proceso de irradiación como método de conservación en alimentos, la espectroscopía de REE constituye la única técnica de análisis para su posible

⁷² Schaich, K. M. EPR methods for detecting and identifying free radicals in foods. Chemistry, Nutrition, and Health, American Chemical Soc, Washington, D.C, 2002; pp 12-34.

caracterización e investigación. Por ello, existen diferentes métodos de REE aprobados para la detección de alimentos irradiados (*EN 1787: 2000, EN 13708: 2001, EN 13751: 2002, EN 13783: 2001 y EN 13784: 2001*). La aplicación de la espectroscopía de REE presenta sin embargo un inconveniente, pues está limitada por el tiempo de vida de los radicales libres producidos durante el proceso de irradiación.⁷³ En la Figura I.27 se muestra un ejemplo de aplicación del análisis mediante REE para la detección de irradiación en el rango de 0-4 kGy en muestras de médula de jamón ibérico.⁷⁴

⁷³ Šimko, M. P. B. *J. Food and Nutr. Res.* **2007**, 46, 75-83.

⁷⁴ Escudero, R.; Valhondo, M.; Ordóñez, J. A.; de la Hoz, L.; Cabeza, M. C.; Velasco, R.; Cambero, M. I. *Food Chem.* **2012**, 133, 1530-1537.

I.3. Análisis Metabólico.

Las tecnologías “ómicas” son un conjunto de metodologías analíticas de alto rendimiento empleadas en diferentes disciplinas. Entre ellas, la Genómica, la Proteómica y la Metabolómica, permiten detectar a gran escala en cualquier sistema biológico los genes, proteínas y metabolitos (Figura I.28). Estas nuevas tecnologías generan y agrupan esta información con el fin de obtener una visión lo más completa posible del sistema en estudio.

La *metabolómica*, la más reciente de las ciencias ómicas, ha emergido con fuerza desde principios de la década de los noventa.⁷⁵ Esta ciencia estudia el conjunto de metabolitos presentes en un medio biológico, lo que la convierte en una herramienta fundamental en diferentes campos tales como la fisiología, el estudio de enfermedades, el descubrimiento de nuevos fármacos, la nutrición y la ciencia y tecnología de los alimentos.

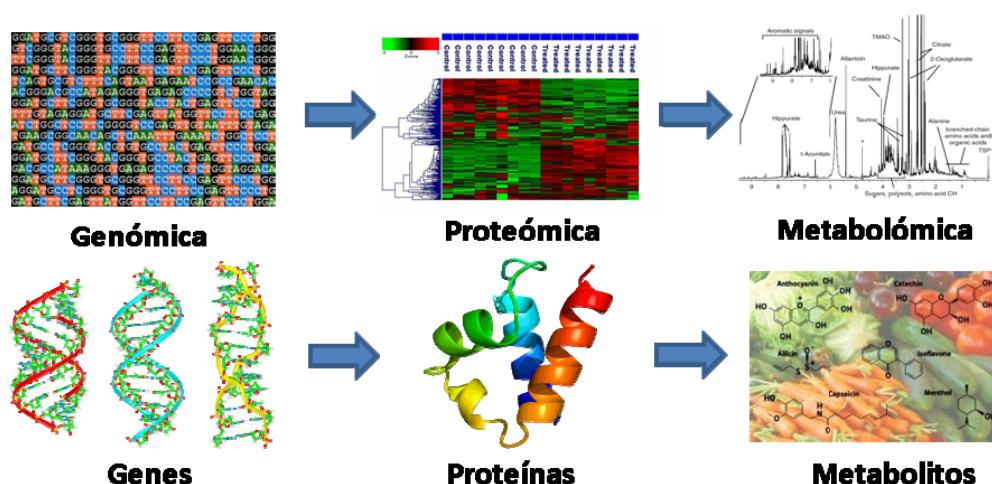


Figura I.28. Esquema representativo de las principales técnicas ómicas.

La metabolómica de los alimentos permite tener una visión más profunda, y mayor control sobre la base bioquímica de las cosas que comemos. El estudio de los alimentos y su bioactividad mediante técnicas masivas de análisis (genómica, proteómica y metabolómica) se ha definido como *foodómica* o *alimentómica*.⁷⁶ Esta disciplina pretende profundizar en cómo los alimentos repercuten en la prevención o la evolución de las enfermedades, abordar el estudio global de aspectos esenciales de los alimentos, como su seguridad, calidad y trazabilidad y por ende la detección de nuevos contaminantes, la

⁷⁵ Schmidt, C. W. *Environ. Health Perspect.* **2004**, 112, 410-415.

⁷⁶ García-Cañas, V.; Simó, C.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 10150-10159.

determinación de modificaciones en alimentos transgénicos y la definición de nuevos biomarcadores.⁷⁷

El término "*metabolome*", introducido por Oliver et al. en 1998, hace referencia a la medida de los cambios en concentración de todas las moléculas de bajo peso molecular presentes en las células.⁷⁸ El metaboloma se compone de muchos miles de metabolitos que son el resultado final de la expresión génica. Por todo ello, la metabolómica comprende el análisis y procesado de una amplia gama de compuestos con diferente naturaleza química, solubilidad y concentración. Los metabolitos, como moléculas con un tamaño inferior a 1.500 Da, intervienen en los procesos celulares y revelan el comportamiento dinámico de los sistemas biológicos mediante la creación de redes interconectadas (rutas metabólicas) entre moléculas relacionadas.⁷⁹

La metabolómica permite mostrar cambios mínimos en las rutas metabólicas incluso antes de que sea posible detectar alteraciones a nivel del fenotipo,⁸⁰ debido a que los metabolitos no son simple productos enzimáticos de las reacciones bioquímicas sino que también forman parte de la regulación de los procesos que tienen lugar en los sistemas biológicos.⁸¹ Cuando hablamos de metabolitos nos referimos a iones inorgánicos, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, etc., los cuales presentan un amplio intervalo de polaridades, tamaños moleculares, carga a pH fisiológico, etc. La ausencia o presencia de algunos de estos compuestos, así como la concentración relativa entre ellos, puede ser un indicador de estados de enfermedad o de factores de predisposición a ella. Se estima que en un ser vivo el número de metabolitos oscila entre 3.000 y 20.000, el de genes está entorno a unos 30.000 y el de proteínas alrededor de 100.000. Mientras la genómica y la proteómica indican lo que podría haber pasado, la metabolómica informa de lo que realmente ha pasado y por lo tanto es la ciencia que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos. Así, en la respuesta metabolómica intervienen todos los factores

⁷⁷ Cifuentes, A. *Foodomics: Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition*; John Wiley & Sons: 2013; Vol. 52.

⁷⁸ Oliver, S. G.; Winson, M. K.; Kell, D. B.; Baganz, F. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 373-378.

⁷⁹ Syggelou, A.; Iacovidou, N.; Atzori, L.; Xanthos, T.; Fanos, V. *Pediatr. Clin. North Am.* **2012**, 59, 1039-1058.

⁸⁰ Nambiar, P. R.; Gupta, R. R.; Misra, V. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* **2010**, 693, 3-18.

⁸¹ Putri, S. P.; Yamamoto, S.; Tsugawa, H.; Fukusaki, E. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, 116, 9-16.

que rodean la vida, como la alimentación, el ejercicio, el estrés, el ciclo diurno, etc.⁸²

Las ómicas son *ciencias holísticas*, es decir, consideran el mayor número de variables posibles, para posteriormente extraer la información verdaderamente útil de ellas y trabajarla en su conjunto. En el caso de la metabolómica, el objetivo inicial es analizar el máximo número de metabolitos posibles y seleccionar los que aportan información, a partir de los algoritmos de procesamiento de las señales adquiridas. Esta aproximación permite un nuevo enfoque en la investigación bioquímica y biomédica, ya que no es necesario partir de hipótesis restringidas. Hasta el advenimiento de las ciencias ómicas, cuando se planteaba un experimento se realizaban hipótesis sobre los genes, proteínas y caminos metabólicos clave que interesaba estudiar; pero si la hipótesis de partida era errónea o incompleta, debía iniciarse un nuevo experimento, con la consiguiente pérdida de tiempo y recursos. El uso de las ciencias ómicas permite iniciar la investigación sin hipótesis previas y por lo tanto es posible explorar de forma simultánea diversas posibilidades y vías o rutas metabólicas. Por tanto, la metabolómica permite clasificar las muestras, entender mejor los mecanismos bioquímicos, identificar los posibles biomarcadores, cuantificar los metabolitos en distintos entornos biológicos, etc.

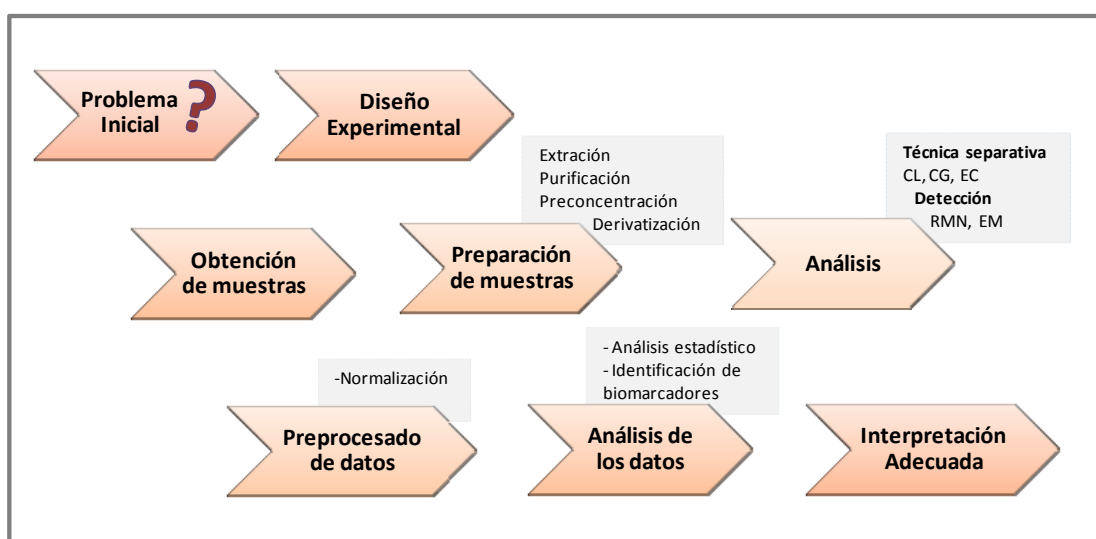


Figura I.29. Flujo de trabajo habitual en un estudio metabolómico.

⁸² Ryan, D.; Robards, K. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7954-7958.

La Figura I.29 muestra el flujo de trabajo habitual en un análisis metabolómico, desde el planteamiento del problema inicial a la interpretación adecuada de los resultados. En los siguientes apartados desgranaremos los diferentes niveles de información de los análisis metabolómicos que definirán las primeras etapas del estudio (desde el diseño experimental a la preparación de muestra), las principales técnicas analíticas que podremos utilizar en nuestro estudio, las etapas del procesado de los datos adquiridos y las principales técnicas quimiométricas que permiten extraer la mejor interpretación de la compleja matriz de datos de los estudios metabolómicos.

I.3.1. Principales tipos de análisis metabolómicos.

Antes de empezar un estudio metabólico, en función del conocimiento previo acerca del problema biológico/bioquímico y de la información que se quiera obtener del estudio, se seleccionará el tipo de análisis metabolómico más apropiado. En aquellos casos en los que se conozca el número y tipo de metabolitos de interés, se puede realizar una *aproximación dirigida*. Por el contrario, en los casos en los que no se tenga suficiente información de los metabolitos que puedan estar implicados en el proceso estudiado, se llevarán a cabo *aproximaciones no-dirigidas*. Por tanto, en función del enfoque utilizado para dar respuesta a las preguntas específicas del análisis los diferentes estudios se podrán clasificar en dirigidos (*Targeted*) o no dirigidos (*Untargeted*).^{83,84}

I.3.1.1 Análisis dirigido (*Targeted Analysis*).

El análisis dirigido es un tipo de análisis diana, que se centra en el estudio de uno o varios metabolitos seleccionados en función de conocimientos previos. Por tanto, en este tipo de análisis podremos particularizar tanto la preparación de muestra como la técnica de análisis más conveniente para identificar y cuantificar los compuestos seleccionados en el estudio.⁸⁵ Un ejemplo de este tipo de análisis es el protocolo desarrollado por Mannina et al. para detectar la adición fraudulenta de aceite de avellana al aceite de oliva. El protocolo desarrollado se basó en el análisis mediante ¹H-RMN de las mezclas de aceites y

⁸³ Fiehn, O. *Plant Mol. Biol.* **2002**, 48, 155-171.

⁸⁴ Laghi, L.; Picone, G.; Capozzi, F. *Trends Anal. Chem.* **2014**, 59, 93-102.

⁸⁵ Nicholson, J. K.; Foxall, P. J.; Spraul, M.; Farrant, R. D.; Lindon, J. C. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 793-811.

en la identificación y cuantificación de seis señales seleccionadas del espectro de RMN.⁸⁶

1.3.1.2 Análisis no dirigido (*Untargeted Analysis*).

En un análisis no dirigido se pretende determinar simultáneamente tantos metabolitos como sea posible para obtener una visión global del problema. Dado que en una aproximación *no dirigida* no se posee información previa, es particularmente importante aplicar un análisis detallado que permita detectar el mayor número posible de metabolitos sin introducir ningún sesgo, ya sea debido a la preparación de muestra o a la técnica de detección seleccionada. Otro aspecto a destacar en este tipo de análisis, es el complejo y lento proceso de identificación de los metabolitos. En función del objetivo del estudio, el análisis metabolómico no dirigido engloba diferentes estrategias que se detallan a continuación.⁸⁷

1.3.1.2.1 Análisis de perfiles metabólicos (*Metabolomic Profiling*).

Para interpretar el efecto de una o de varias rutas metabólicas concretas, no es necesario estudiar la variación de todo el metaboloma. El procedimiento analítico puede restringirse a la identificación y cuantificación de un número escogido de metabolitos de la muestra biológica. Este proceso se denomina análisis de perfiles metabólicos. Este tipo de enfoque es adecuado cuando los metabolitos de interés están predefinidos al inicio del estudio, de modo que todas las etapas de experimentación y análisis de los datos se optimizan para la determinación de dichos compuestos. Los metabolitos predefinidos pueden pertenecer, por ejemplo, a una clase de compuestos (lípidos o hidratos de carbono), o simplemente a los metabolitos de una ruta seleccionada. Este tipo de análisis fue utilizado por Ohno et al. para evaluar, mediante la combinación de la espectroscopía de ¹H-RMN y del análisis quimiométrico, el efecto de la altitud en el crecimiento del té negro. Para ello se centró en el estudio del perfil metabólico de la fracción fenólica.⁸⁸

⁸⁶ Mannina, L.; D'Imperio, M.; Capitani, D.; Rezzi, S.; Guillou, C.; Mavromoustakos, T.; Molero-Vílchez, M. D.; Herrera, A.; Thomas, F.; Aparicio, R.. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11550-11556.

⁸⁷ Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 826-828.

⁸⁸ Ohno, A.; Oka, K.; Sakuma, C.; Okuda, H.; Fukuhara, K. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5181-5187.

1.3.1.2.2 Análisis metabolómicos (*Metabolomic*).

El efecto de un tratamiento tecnológico sobre las características de los alimentos, con bastante frecuencia, no se limita a una única ruta bioquímica. Para poder entender el efecto global, es necesario un análisis exhaustivo que permita identificar y cuantificar todos los metabolitos presentes en la muestra. Teniendo en cuenta que este enfoque revela el metaboloma del sistema biológico estudiado, estaremos ante un análisis *metabolómico*. En los estudios metabolómicos se deben seleccionar aquellos métodos de preparación de muestra y aquellas técnicas de análisis que eviten la eliminación de cualquiera de los metabolitos presentes. Dada la complejidad de los datos metabolómicos, se necesitarán todas aquellas herramientas que permitan manejar, almacenar, normalizar y evaluar los datos adquiridos con el fin de describir la respuesta del sistema biológico, incluyendo aquellas estrategias necesarias para identificar los metabolitos no descritos previamente. Este tipo de análisis metabolómico fue empleado por Savorani et al. para evaluar cómo las diferentes condiciones empleadas en la cría de dorada (*Sparus aurata*) influyen en su perfil metabólico.⁸⁹ Ercolini et al. emplearon también este tipo de análisis para poder monitorizar la evolución del metaboloma de muestras cárnicas almacenadas bajo diferentes condiciones de envasado.⁹⁰ En ambos trabajos, el empleo de las técnicas multivariantes de análisis permitió identificar aquellos metabolitos que variaron como consecuencia de los diferentes tratamiento/condiciones empleadas y, de este modo, pudieron identificar el conjunto de biomarcadores capaces de monitorizar la evolución del producto alimentario bajo las diferentes condiciones estudiadas.

1.3.1.2.3 Análisis de huellas metabólicas (*Metabolomic Fingerprinting*).

En ocasiones, para evaluar un gran número de factores en programas de mejora y permitir el uso diagnóstico en las rutinas de la industria o en los ensayos clínicos, no es necesario determinar el nivel individual de cada metabolito. En lugar de ello, a menudo es suficiente el uso de la medida global de los metabolitos para clasificar rápidamente las muestras y así poder

⁸⁹ Savorani, F.; Picone, G.; Badiani, A.; Fagioli, P.; Capozzi, F.; Engelsen, S. B. *Food Chem.* **2010**, *120*, 907-914.

⁹⁰ Ercolini, D.; Ferrocino, I.; Nasi, A.; Ndagijimana, M.; Vernocchi, P.; La Storia, A.; Laghi, L.; Mauriello, G.; Guerzoni, M. E.; Villani, F. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7372-7381.

mantener un alto rendimiento en el análisis. Este tipo de estudio se denomina *análisis de huellas metabólicas*. Es un análisis no dirigido, rápido, global, no cuantitativo que se centra en la observación de todo el metaboloma con fines principalmente clasificatorios. Un ejemplo de este tipo de análisis fue el desarrollado por Mallamace et al., donde a partir de las huellas metabólicas pudo diferenciar muestras de tomates *cherry* cultivados en la zona siciliana de Pachino, (acreditado por el Certificado Europeo Indicación Geográfica Protegida, IGP), de aquellos cultivados en otras áreas geográficas.⁹¹

En la Tabla I.1 se recoge a modo de resumen las definiciones de los términos más empleados en Metabolómica.

Tabla I.1. Resumen de la terminología utilizada en metabolómica.

Término	Definición
Metaboloma	Conjunto de moléculas de bajo peso molecular (metabolitos) que se encuentran en el interior o son secretadas por una célula o tejido. ⁹²
Metabonomía	Medición cuantitativa de la respuesta metabólica de naturaleza dinámica y multiparamétrica de los sistemas vivos ante estímulos patofisiológicos o bien, ante la modificación genética. ⁹³
Metabolómica	Análisis completo del metaboloma de un sistema biológico que se encuentra en unas condiciones determinadas. ⁹⁴
Huella metabólica	Medida global de los metabolitos presentes en un sistema biológico (<i>metabolic fingerprint</i>) o consumidos o secretados por el mismo (exometaboloma o <i>metabolic footprint</i>). ⁹⁵
Perfil metabólico	Identificación y cuantificación de un número limitado y predeterminado de metabolitos relacionados entre sí (por presentar similitudes físico-químicas o por participar en una ruta metabólica concreta). ⁹⁶

⁹¹ Mallamace, D.; Corsaro, C.; Salvo, A.; Cicero, N.; Macaluso, A.; Giangrosso, G.; Ferrantelli, V.; Dugo, G. *Physica A* **2014**, 401, 112-117.

⁹² Oliver, S. G.; Winson, M. K.; Kell, D. B.; Baganz, F. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 373-378.

⁹³ Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. *Xenobiotica* **1999**, 29, 1181-1189.

⁹⁴ Fiehn, O. *Comp. Funct. Genomics* **2001**, 2, 155-168.

⁹⁵ Fiehn, O. *Plant Mol. Biol.* **2002**, 48, 155-171.

⁹⁶ Fiehn, O. *Comp. Funct. Genomics* **2001**, 2, 155-168.

I.3.2. Principales técnicas de análisis.

La selección del método analítico a emplear dependerá del tipo de análisis escogido. Para ello se tendrá en cuenta la capacidad de la técnica para poder llevar a cabo la cuantificación y la identificación de los metabolitos, el número de metabolitos que se quieren estudiar y el tiempo necesario para un único análisis, incluyendo la preparación de la muestra.

La RMN y la espectrometría de masas (EM) son las principales técnicas analíticas empleadas para el desarrollo de estudios metabolómicos.^{97,98} Esto se debe a que estas técnicas permiten hacer un análisis de "alto rendimiento" (*high-throughput*) simultáneamente sobre una amplia variedad de metabolitos, obteniéndose una información espectroscópica/estructural con alta precisión analítica. La EM, por lo general, requiere un paso de separación de los metabolitos previo al análisis, tanto cuando se utiliza acoplada a la cromatografía de gases (CG) como a la cromatografía líquida (CL). Otras técnicas como la electroforesis capilar (EC) acoplada a EM,⁹⁹ o la espectroscopía de infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR),¹⁰⁰ también han sido utilizadas recientemente en estudios metabolómicos. La Tabla I.2 muestra el número de publicaciones relacionadas con metabonomía o metabolómica y las principales técnicas de análisis empleadas.¹⁰¹

Tabla I.2. Número de trabajos publicados en los últimos 15 años en análisis metabolómico con las principales técnicas analíticas.

Palabra Clave	[2000-2015]
[metabolom*] o [metabonom*] +	
RMN	8337
EM	10205
Otras (FTIR, UV-Vis)	72

Para poder seleccionar la técnica más conveniente en el estudio metabolómico, se tendrá en cuenta tanto las ventajas como los inconvenientes

⁹⁷ Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. *Pharm. Res.* **2006**, *V23*, 1075-1088.

⁹⁸ Cevallos-Cevallos, J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E.. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 557-566.

⁹⁹ Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 212-224.

¹⁰⁰ Corte, L.; Tiecco, M.; Roscini, L.; De Vincenzi, S.; Colabella, C.; Germani, R.; Tascini, C.; Cardinali, G. *PLoS One* **2015**, *10*, e0115275.

¹⁰¹ Fuente Thomas Reuters ISI Web of Science® utilizando las palabras clave [metabolomic] o [metabonomic] y [NMR] o [MS] o [UV-VIS] o [FTIR].

de cada uno de los métodos de análisis. La Tabla I.3 muestra las principales ventajas y desventajas de las principales técnicas analíticas (RMN, CG-EM, CL-EM y FTIR) utilizadas en el cribado de alto rendimiento en estudios metabolómicos.

Tabla I.3 Ventajas y desventajas de las principales técnicas analíticas que permiten realizar un cribado de alto rendimiento metabolómico.

Técnica Analítica	Ventajas	Desventajas
RMN	<ul style="list-style-type: none"> • Alto rendimiento (<i>High throughput</i>). • Robusta. • Altamente reproducible. • Cuantitativa. • No destructiva. • Mínima preparación de muestra. <ul style="list-style-type: none"> • No requiere derivatización. • No requiere separación. • Rápida (2-6 min /muestra) • Información estructural muy específica 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja Sensibilidad (μM). • Instrumentación costosa. • Laboriosa interpretación de los datos espectrales.
CG-EM	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de retención reproducible. • Compuestos volátiles y semivolátiles. • Bajo coste de la instrumentación frente a RMN y CL-EM. • Cuantitativa (con calibración). • Bajo límite de detección (pM) • Alto poder de resolución y precisión. 	<ul style="list-style-type: none"> • Destructiva. • Requiere derivatización. • Requiere separación. • Lenta (20-30 min/muestra). • Dificultad para identificar nuevos compuestos.
CL-EM	<ul style="list-style-type: none"> • Muy bajo límite de detección (fM). • Alta precisión, poder de resolución y especificidad. • Aplicable a matrices complejas, compuestos polares y apolares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Destructiva. • Menos robusta que RMN y CG-EM. • Problemas de efecto matriz. • Formación de múltiples aductos.
FTIR	<ul style="list-style-type: none"> • Coste relativamente bajo. • Proporciona abundante información espectroscópica. • No necesita derivatización. • Análisis rápido. 	<ul style="list-style-type: none"> • El agua es un problema en el IR medio; en general las muestras tienen que ser liofilizadas. • Las mezclas pueden complicar la interpretación de los datos. • No todos los compuestos pueden ser detectados. • Baja especificidad química.

Una de las principales ventajas de la espectroscopía de RMN es su universalidad. En el espectro de ^1H -RMN se observan todos aquellos compuestos que tienen protones en su estructura, lo que implica a la práctica totalidad de los metabolitos. Ello evita el sesgo sobre clase alguna de compuestos. La RMN es una técnica de análisis especialmente útil para obtener

información estructural y poder llevar a cabo la identificación de los metabolitos presentes. Esta información se puede adquirir a partir de los experimentos 1D y 2D de RMN de la propia muestra o de su extracto. Para confirmar la asignación se comparan los resultados con las bases de datos existentes y, si fuera necesario, se realiza la adición, sobre la propia muestra, del compuesto estándar. Por otro lado, la sensibilidad de RMN se considera una de las principales limitaciones en su aplicación al análisis metabolómico, especialmente en comparación con la mayor sensibilidad alcanzada con los análisis realizados con EM. Sin embargo, los continuos desarrollos en hardware (intensidad de campo magnético, diseño de la sonda de radiofrecuencia (rf), electrónica de la consola), han llevado a que la sensibilidad de la RMN haya aumentado considerablemente. La invención y el desarrollo de las sondas criogénicas,¹⁰² en las que la bobina de la sonda de rf y el preamplificador, se encuentran a una temperatura cercana a los 20 K, ha permitido aumentar la sensibilidad de los experimentos de RMN hasta en un factor de cuatro, mediante la reducción del ruido térmico. Dichas sondas ya se han empleado recientemente en el estudio de alimentos.^{103,104} Sin embargo, el alto coste de su mantenimiento y el problema que presentan por la reducción de la S/R al trabajar con disoluciones conductoras, como las tamponadas,¹⁰⁵ hacen que el uso de sondas criogénicas sea menos apropiado para el análisis metabolómico rutinario.

La sensibilidad de un análisis de RMN depende de varios factores. En el análisis de muestras complejas uno de los parámetros que afecta al límite de detección es el *rango dinámico* del espectrómetro.¹⁰⁶ Se requieren equipos con un rango dinámico elevado para poder llevar a cabo la detección de biomoléculas en muestras donde la diferencia de concentraciones entre los

¹⁰² Voehler, M. W.; Collier, G.; Young, J. K.; Stone, M. P.; Germann, M. W. *J. Magn. Reson.* **2006**, *183*, 102-109.

¹⁰³ Jézéquel, T.; Deborde, C.; Maucourt, M.; Zhendre, V.; Moing, A.; Giraudeau, P. *Metabolomics* **2015**, *11*, 1231-1242.

¹⁰⁴ Kwon, D.; Jeong, H.; Moon, H.; Kim, H.; Cho, J.; Lee, J.; Hong, K. S.; Hong, Y. *Food Res. Int.* **2015**, *67*, 175-182.

¹⁰⁵ Kelly, A. E.; Ou, H. D.; Withers, R.; Dötsch, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12013-12019.

¹⁰⁶ La FID es una señal analógica que debe ser almacenada digitalmente. Para ello, la FID se almacena a través de lecturas realizadas a intervalos de tiempos definidos. Esta transformación analógico-digital se lleva a cabo a través del convertidor analógico digital. El *Rango Dinámico* mide la capacidad de digitalizar señales débiles frente a otras mucho más intensas. Para la detección de biomoléculas en agua donde las relaciones molares son extremadamente desfavorables (protones del H₂O: 110M, biomolécula: ~ 1mM), se requerirá, por tanto, de un rango dinámico elevado.

componentes mayoritarios y los minoritarios puede ser de varios órdenes de magnitud ¿*Pero cuántos compuestos pueden ser detectados simultáneamente mediante RMN?* En una sola especie vegetal, su metaboloma puede estar constituido por unos 5.000-10.000 metabolitos (Figura I.30) pero sólo una pequeña parte, "la punta del iceberg", se puede detectar mediante RMN. La concentración de la mayoría de los metabolitos presentes en las muestras vegetales es inferior a 1 μM , que está por debajo del límite de detección de los espectrómetros de RMN convencionales (por encima de 10 μM).¹⁰⁷ Sin embargo, aunque el número de compuestos detectados es limitado, los espectros de RMN dan una buena imagen de lo que realmente está presente; los compuestos menores pueden no ser detectados, pero las principales tendencias son claras. A esto hay que sumar que, generalmente, en las investigaciones metabolómicas las variaciones experimentadas por los metabolitos entre las diferentes muestras suelen ser importantes.

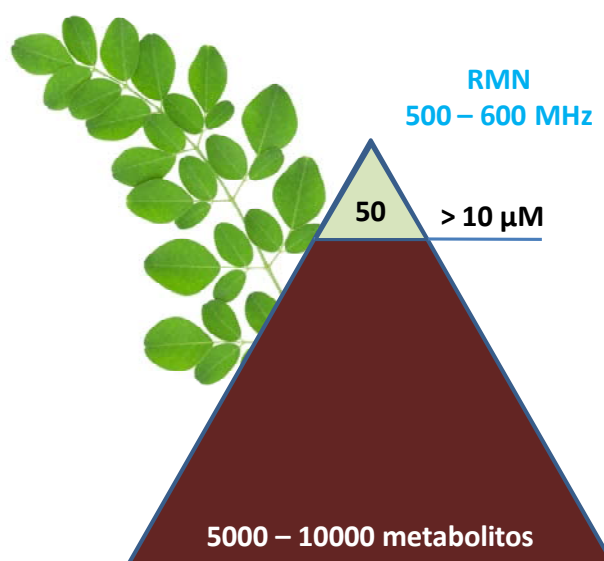


Figura I.30. Número de metabolitos detectables en un único experimento de rutina de RMN (utilizando equipos de alto campo) con respecto al número de metabolitos presentes en una sola especie vegetal.

Otras técnicas de análisis empleadas en estudios metabolómicos, como la EM, permiten la detección de cientos de metabolitos pero muchos de ellos permanecen sin ser identificados.¹⁰⁸ Frente a esta carencia, la espectroscopía de RMN se presenta como un método robusto y cuantitativo, donde la

¹⁰⁷ Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, 66, 1-39.

¹⁰⁸ Cevallos-Cevallos, J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, 20, 557-566.

concentración de un metabolito seleccionado en una mezcla puede ser directamente comparada entre las diferentes muestras, independientemente de su composición. Además, la preparación de muestra, frente a otros métodos de análisis, es simple, rápida, directa y sin necesidad de realizar procesos de derivatización.

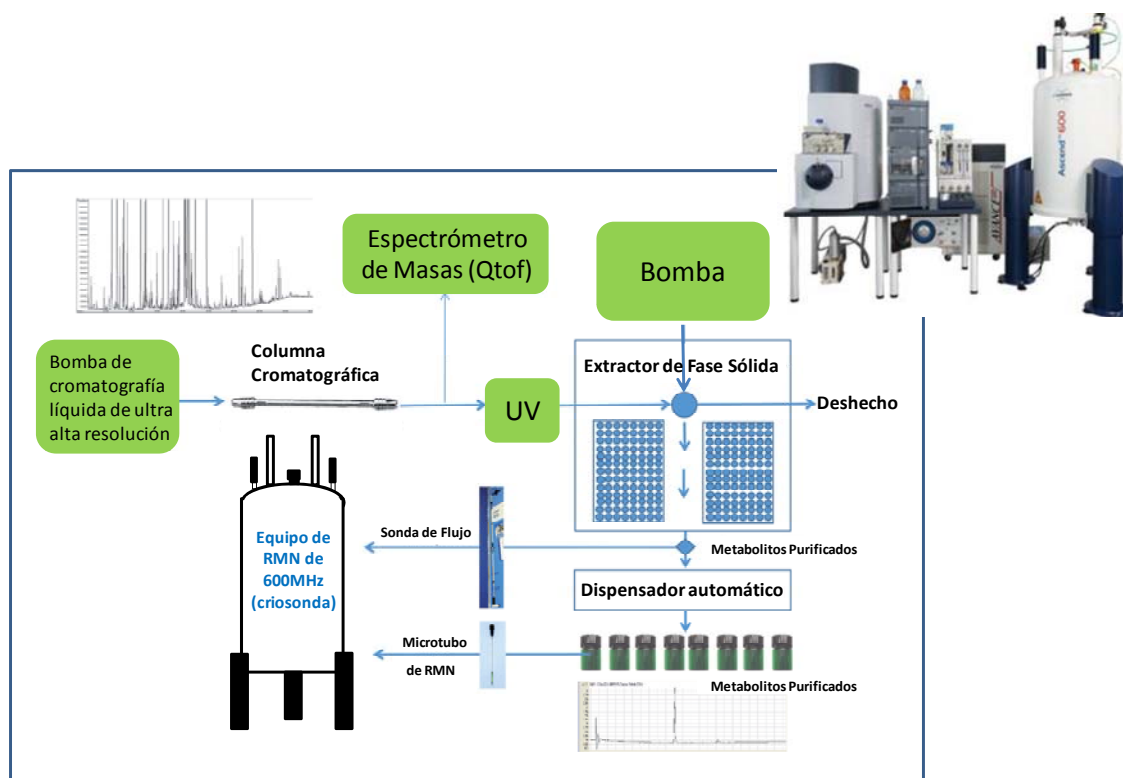


Figura I.31. Diagrama de flujo en un plataforma analítica que engloba diferentes técnicas de separación y detección.

Como se mencionó anteriormente, el metaboloma de las plantas es una extraordinaria reserva de nuevas moléculas. En los últimos años, el interés por la búsqueda de nuevos productos naturales como fuente de nuevos agentes terapéuticos no ha cesado de crecer. El desarrollo de sistemas de análisis combinados representa un avance significativo en el campo de la fitoquímica.^{109,110,111} Esta evolución instrumental ha permitido combinar las ventajas que presentan las diferentes técnicas de análisis para poder dar una respuesta global al problema biológico mediante un análisis metabolómico.^{112,113}

¹⁰⁹ Wolfender, J. L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K. *Phytochem. Anal.* **2001**, 12, 2-22.

¹¹⁰ Grosso, C.; Jäger, A. K.; Staerk, D. *Phytochem. Anal.* **2013**, 24, 141-147.

¹¹¹ Cakova, V.; Urbain, A.; Antheaume, C.; Rimlinger, N.; Wehrung, P.; Bonté, F.; Lobstein, A. *Phytochem. Anal.* **2015**, 26, 34-39.

¹¹² Schlotterbeck, G.; Ceccarelli, S. M. *Bioanalysis* **2009**, 1, 549-559.

¹¹³ Sumner, L. W.; Lei, Z.; Nikolau, B. J.; Saito, K. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 212-229.

La Figura I.31 muestra el diagrama de flujo de un equipo de cromatografía líquida de ultra alta presión con detector ultravioleta, espectrómetro de masas, extracción en fase sólida y resonancia magnética nuclear (*UHPLC-UV-MS-SPE-NMR*).

I.3.3. Procesado de los datos espectroscópicos de ^1H -RMN.

La señal obtenida a partir de las diferentes técnicas analíticas, no es utilizable directamente por las herramientas bioinformáticas necesarias realizar el análisis quimiométrico, con lo cual, es necesario realizar una serie de operaciones básicas (habitualmente llamadas pre-procesado de los datos). Éstas incluyen la corrección de fase del espectro, la corrección de la línea base, la calibración del desplazamiento químico, etc. Las etapas habituales de preprocesado de los datos de RMN obtenidos directamente (FID) son:

1. Transformada de Fourier.

En la espectroscopía de RMN se utiliza la operación matemática denominada *transformada de Fourier* (FT) para convertir los datos obtenidos en el espectrómetro en el dominio del tiempo (FID), al dominio de la frecuencia (espectro de RMN). Esta operación da lugar a dos soluciones (espectros): una real (señales de absorción), dependiente de la función *cos* y otra imaginaria (señales de dispersión), dependiente de la función *sen*.

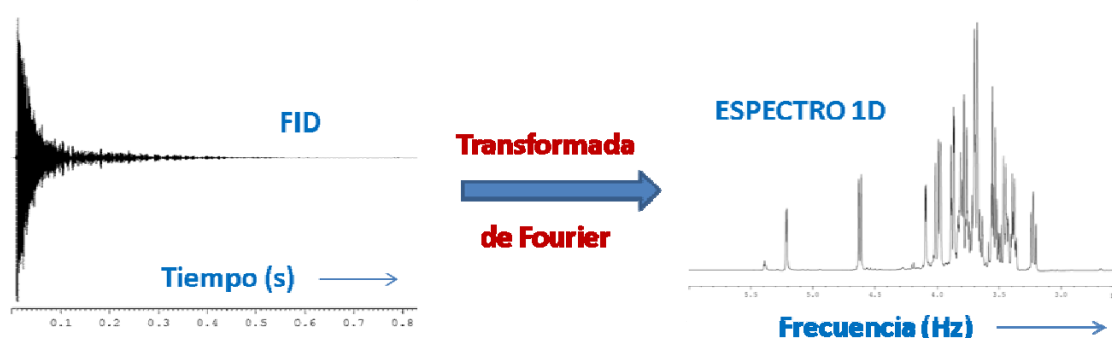


Figura I.32. Ejemplo de aplicación de la Transformada de Fourier a la FID obtenida de una muestra de miel.

Naturalmente, los métodos cuantitativos requieren que los ajustes aplicados a los datos obtenidos en el dominio de tiempos, antes de realizar la Transformada de Fourier (*llenado con ceros y multiplicación por funciones de*

pesada)¹¹⁴ sean iguales para todas las muestras a evaluar, ya que pueden influir en los detalles más profundos del espectro.

2. Corrección de fase del espectro.

Cualquier espectro de RMN es una mezcla de la solución real (señal de absorción) y de la solución imaginaria (señal de dispersión) de la transformada de Fourier. Este hecho lleva a la obtención de señales en las que la forma de línea se encuentra más o menos distorsionada. Combinando adecuadamente ambas soluciones, esto es, corrigiendo la proporción absorción/dispersión de las señales, se consigue solucionar el problema, como muestra la Figura 1.33.



Figura 1.33. Corrección de fase de un espectro de ^1H -RMN de una muestra de miel.

3. Corrección de la línea base.

A través del ajuste empleando diferentes funciones (polinómica, seno o exponencial), se puede realizar el ajuste de la línea base al valor cero de intensidad de señal para poder obtener unos valores de integral que sean fruto de la concentración real del metabolito estudiado.

4. Calibración del desplazamiento químico.

Como ya se desarrolló en la sección I.2.3.1.3, durante la preparación de la muestra es frecuente el uso de estándares internos para realizar la correcta calibración del desplazamiento químico. En los casos donde no se hace uso del estándar interno, la calibración se suele realizar sobre una señal que se toma de

¹¹⁴ La operación del **llenado de ceros** consiste en añadir un número de puntos (potencia de 2) a continuación del último punto de la FID, lo que permite aumentar la resolución digital (Hz/punto) de forma que se definen mejor las señales. La multiplicación de la FID por funciones de *pesada* (*apodización*), tiene por objeto aumentar la sensibilidad y la resolución del espectro.

referencia como puede ser la de un metabolito conocido o la propia señal del disolvente.

5. Normalización de los ajustes.

En un estudio metabolómico, una vez corregida la fase, la línea base y calibrado correctamente el desplazamiento químico de todos los espectros que conforman el estudio, se suele realizar, previo al análisis estadístico, un proceso de verificación, que consiste en superponer todos los espectros registrados y comprobar si presentan los mismos ajustes de línea base. Este suele ser un proceso iterativo que generalmente implica un reprocesado continuo de alguno de los espectros para adecuarlo al resto.

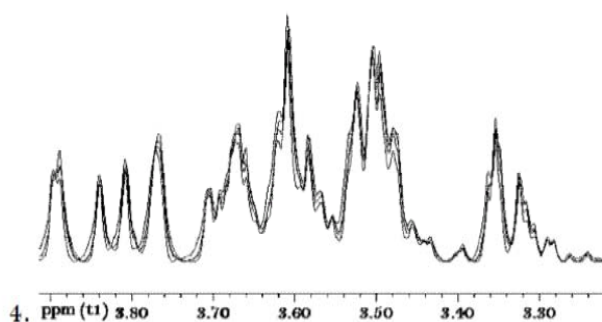


Figura 1.34. Normalización de un conjunto de espectros.

El objetivo de la normalización de los ajustes es permitir la comparación significativa de las muestras dentro del conjunto de datos y que una vez realizada la comparación, las diferencias que se observen sean debidas únicamente a la variación en los analitos presentes en la muestra.

6. Segmentación espectral. (Regiones/Cubos espectrales).

La segmentación del espectro, también conocida como *bucketing* o *binning*, es un proceso ampliamente utilizado en el que el espectro se subdivide en un número de regiones. En la mayoría de los casos se emplea o una segmentación *fija*, que consiste en dividir el espectro en regiones iguales, o una *personalizada*, donde es el propio usuario el que define la anchura de cada una de las regiones en las que se segmenta el espectro.

En un espectro de ^1H -RMN, por ejemplo, con una anchura espectral típica de 12 ppm y donde se realiza una segmentación fija de 0.04 ppm, quedarán definidos, como se muestra en la Figura 1.35, 300 segmentos o “*buckets*”.

Finalmente, se genera una tabla de datos con los valores de la integración de cada uno de los segmentos seleccionados para cada uno de los espectros estudiados. Esta tabla constituirá la base de datos para poder llevar a cabo el análisis quimiométrico.

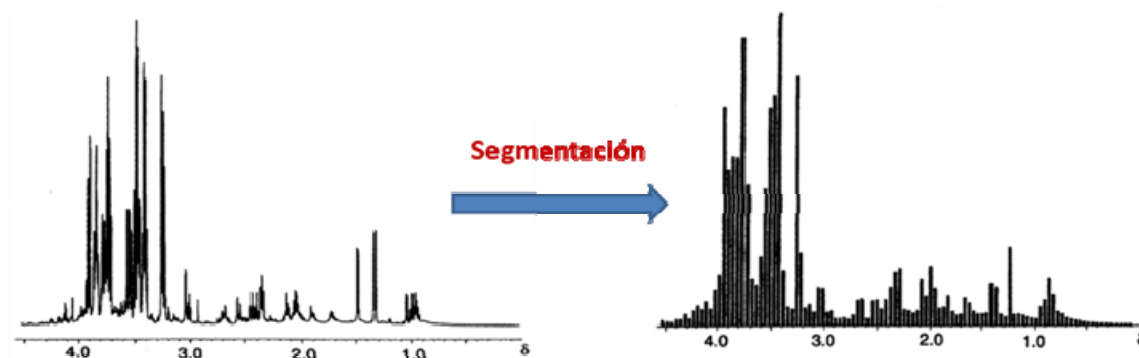


Figura I.35. Ejemplo de la segmentación de un espectro de ^1H -RMN en regiones de 0.04 ppm.

I.3.4. Métodos quimiométricos de análisis.

Un estudio metabolómico habitualmente conlleva un gran número de muestras, cada una de las cuales contiene cientos o miles de variables, de tal manera que para ser interpretados los datos obtenidos, se requiere de un proceso de reducción de su dimensionalidad. El procesamiento de los datos y el posterior análisis estadístico en metabolómica requiere la aplicación de la *quimiometría*, que se define, como el conjunto de herramientas matemáticas y estadísticas que permiten extraer la información relevante de los datos producidos en los experimentos químicos.¹¹⁵ El análisis estadístico en RMN metabolómica se realiza sobre los datos espectrales, generalmente, dispuestos en una matriz de datos (X), que contiene tantas filas como muestras (n) y tantas columnas (k) como *buckets* se hayan empleado para segmentar el espectro de RMN.

Como se muestra en la Figura I.36, el análisis estadístico se puede clasificar principalmente en análisis multivariante y análisis univariante.^{116,117} El

¹¹⁵ Lavine, B.; Workman, J. J. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3365-3372.

¹¹⁶ Korman, A.; Oh, A.; Raskind, A.; Banks, D. In *Statistical methods in metabolomics*; Anisimova, M., Ed.; Evolutionary Genomics; Springer: 2012; pp 381-413.

¹¹⁷ Stevens, J.; Weimer, B.; Slupsky, C. Statistical methods in metabolomics. *Metabolomics in Food and Nutrition* **2013**, 44.

análisis univariante utiliza únicamente información de cada variable (metabolito) mientras que el *análisis multivariante* emplea de manera conjunta la información de las múltiples variables. Dentro de los métodos de análisis multivariante diferenciaremos entre métodos de clasificación *supervisados* y *no supervisados*. Los métodos *no supervisados* permiten evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta su clasificación dentro de ningún grupo, reduciendo la complejidad de una manera robusta, mientras que los *métodos supervisados*, utilizan la información sobre la clasificación de las muestras para maximizar la separación entre grupos. Generalmente, en primer lugar se emplean métodos estadísticos no supervisados para posteriormente aplicar métodos supervisados.^{118,119,120}

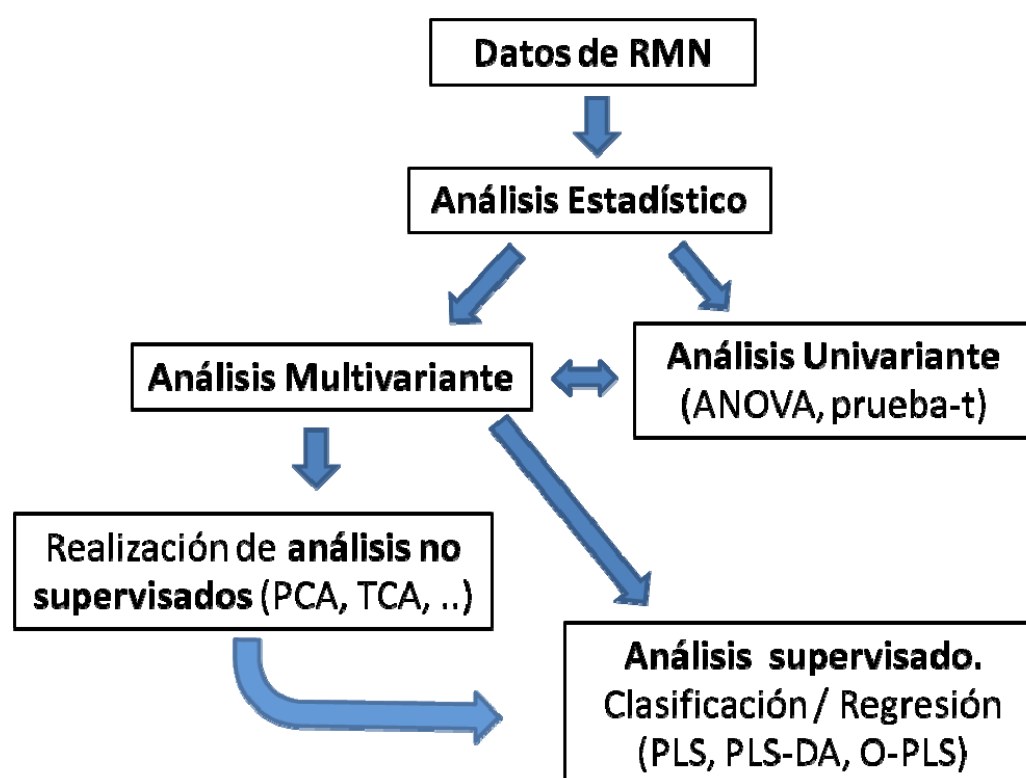


Figura I.36. Esquema general de los métodos de análisis estadístico aplicados a los datos obtenidos mediante RMN.

Previo a la aplicación de cualquier método estadístico de comparación entre grupos de muestras, es conveniente realizar un estudio para comprobar si

¹¹⁸ Uarrota, V. G.; Moresco, R.; Coelho, B.; da Costa Nunes, E.; Peruch, L. A. M.; de Oliveira Neubert, E.; Rocha, M.; Maraschin, M. *Food Chem.* **2014**, *161*, 67-78.

¹¹⁹ Kwon, Y.; Bong, Y.; Lee, K.; Hwang, G. *Food Chem.* **2014**, *161*, 168-175.

¹²⁰ Izquierdo-García, J. L.; Villa, P.; Kyriazis, A.; del Puerto-Nevado, L.; Pérez-Rial, S.; Rodríguez, I.; Hernández, N.; Ruiz-Cabello, J. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *59*, 263-270.

los valores obtenidos siguen una distribución normal y las varianzas son homogéneas dentro de cada grupo de muestras. Para comprobar la normalidad de cada variable en cada grupo, se pueden utilizar diferentes test (*test de Kolmogorov-Smirnov*, *corrección de Lilliefors*, o el *test de Shapiro-Wilk*) que proporcionan los niveles de probabilidad de que la variable presente una distribución normal. Si los datos son normales, se aplicarán posteriormente pruebas estadísticas “*paramétricas*”, mientras que si no presentan dicha distribución, se realizarán pruebas estadísticas “*no paramétricas*”. Generalmente, los test paramétricos comparan valores medios de metabolitos entre grupos mientras que los test no paramétricos, contrastan valores de medianas entre grupos. Como la mayoría de los métodos estadísticos paramétricos asumen que los datos poseen valores de varianza homogéneos entre los grupos de muestras, es recomendable realizar un estudio previo para evaluar dicha homogeneidad. Para comprobar la homogeneidad de las varianzas de las variables en los grupos se pueden emplear diferentes tipos de test, como el *test de Levene*.

1.3.4.1. Análisis Univariante.

Una vez que se conoce la distribución y la homogeneidad de las variables en los grupos de muestras, se puede seleccionar el método de análisis de la varianza más adecuado. El análisis de la varianza es una prueba estadística univariante que tiene como objetivo principal la detección de metabolitos significativamente diferentes entre los grupos considerando, en general, un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. En la Figura.1.37 se muestra un esquema general del procedimiento recomendado en la realización de cualquier análisis de varianza. También se muestran a través de un código de colores, las equivalencias aceptadas entre pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas.

Dentro de los métodos de análisis de varianza paramétricos con varianzas homogéneas, se aplica la prueba de la “*t de student*” (t-test) clásica cuando se comparan dos grupos de muestras y el análisis de varianza de una vía (ANOVA) si se trata de comparar más de dos grupos de muestras independientes. Este tipo de análisis permite seleccionar las variables más discriminantes entre los diferentes grupos.

El análisis univariante puede servir para la selección/reducción de variables antes del análisis multivariante, o también, una vez identificadas las señales más relevantes que permiten la discriminación entre los grupos estudiados mediante el análisis multivariante. Una nueva integración de esas señales en el espectro de RMN junto con el análisis univariante puede confirmar la importancia estadística de los metabolitos seleccionados.^{121,122}

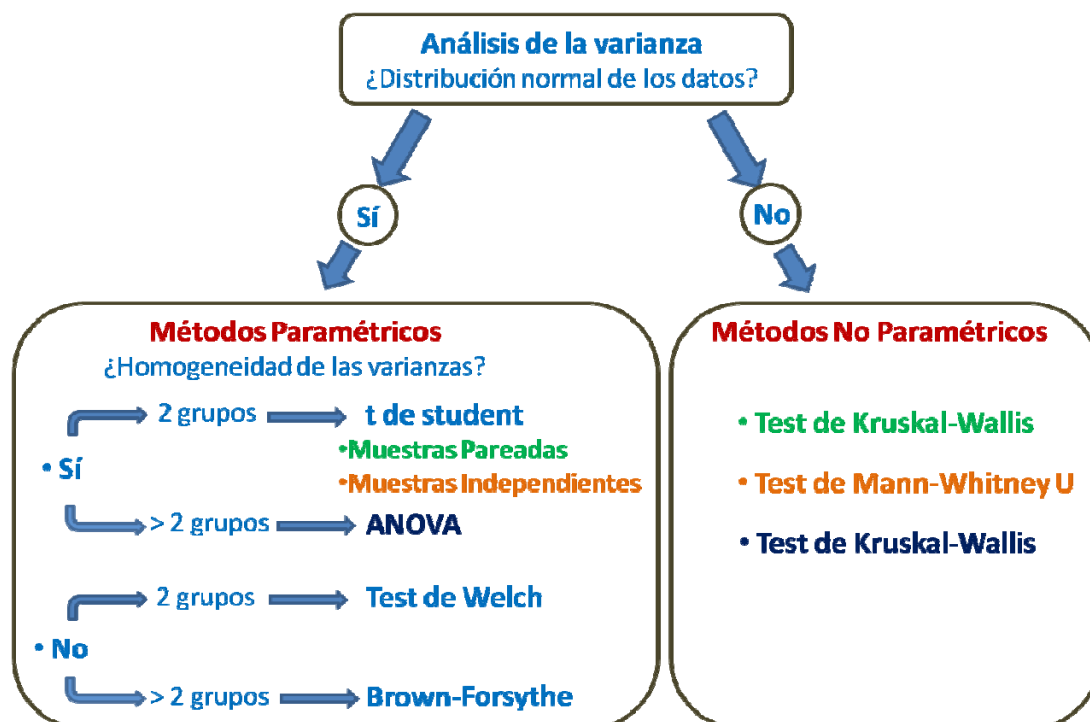


Figura I.37. Esquema general del análisis estadístico univariante.

I.3.4.2. Análisis Multivariante.

En este apartado se describirán brevemente las técnicas estadísticas multivariantes más ampliamente utilizadas en metabolómica, haciendo especial hincapié en aquellas que se han empleado en esta Tesis.

El análisis estadístico multivariante requiere generalmente de la realización de unas transformaciones matemáticas previas al análisis, entre las que se incluye el centrado y el escalado de los datos.^{123,124} El *centrado* convierte

¹²¹ Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, 66, 1-39.

¹²² Ibañez Ruiz, C. *Desarrollo de nuevas estrategias metabolómicas y su aplicación en bioanálisis y "foodómica"*, Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá, Julio de 2013.

¹²³ van den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. *BMC Genomics* **2006**, 7, 142.

¹²⁴ Craig, A.; Cloarec, O.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2262-2267.

todas las concentraciones en fluctuaciones en torno a cero, en lugar de alrededor de la media de intensidades de cada segmento (*bucket*). Mediante esta transformación, se consigue focalizar los resultados sobre las diferencias entre muestras y no sobre la variabilidad global. Por otro lado, los *métodos de escalado* están dirigidos a ajustar las diferencias en las fluctuaciones entre los distintos metabolitos. Los espectros de muestras biológicas presentan normalmente unos pocos metabolitos con concentraciones muy elevadas y muchos otros con señales mucho menos intensas. En función del método de escalado empleado, se consiguen enfatizar diferentes aspectos de los datos experimentales, cada uno con ventajas e inconvenientes, por lo que habitualmente se evalúan las distintas aproximaciones antes de seleccionar el modelo definitivo para el análisis de los datos.¹²⁵ Los métodos de escalado utilizados en la presente Tesis han sido:

- ***Centrado + No Escalado***: Elimina únicamente el valor de la media de cada *bucket* en las variables correspondientes.
- ***Centrado + Varianza Unitaria***: Emplea la desviación estándar de cada variable como factor de escalado. Mediante esta transformación, se consigue que cada variable tenga el mismo peso en la totalidad del espectro, independientemente de la intensidad de la señal en el espectro original.
- ***Centrado + Pareto***: Emplea la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable como factor de escalado. Este método es ampliamente utilizado para el tratamiento de datos espectroscópicos, ya que continúa manteniendo una distribución en el peso de las variables similar a la de los datos originales. Representa un escalado intermedio entre el no escalado y el escalado varianza unidad.

Así, el análisis estadístico multivariante se realiza sobre la matriz de datos transformados.¹²⁶

¹²⁵ Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 536-549.

¹²⁶ Puchades Carrasco, L. *Aplicaciones de la RMN a la identificación de nuevos biomarcadores de utilidad clínica en oncología*, Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, diciembre de 2013.

1.3.4.2.1. Análisis no supervisado de exploración.

Como mencionamos anteriormente, los métodos estadísticos multivariantes no supervisados no tienen en cuenta la información de la pertenencia de las muestras a los grupos de clasificación. Estos métodos son de gran utilidad para la identificación de patrones y/o tendencias dentro de las muestras estudiadas. En muchos casos, los resultados obtenidos en esta etapa son suficientes para distinguir las variaciones entre los grupos en función de sus diferencias metabólicas. Los métodos no supervisados permiten también la detección de muestras *atípicas* o *outliers*, que son muestras que se desvían significativamente del perfil global que muestran los grupos analizados. La eliminación de dichos *outliers* es el punto de partida de todo análisis estadístico. Por tanto, la detección de estas muestras atípicas es fundamental y previa a la aplicación de un análisis supervisado. Algunos ejemplos de técnicas estadísticas no supervisadas son el *análisis de conglomerados* o *clustering* y el *análisis de componentes principales* (PCA). En esta sección nos centraremos en el análisis no supervisado por PCA, que ha sido el análisis empleado en esta Tesis Doctoral.

El análisis de PCA constituye una de las técnicas exploratorias más comunes en el análisis metabolómico,^{127,128} ya que permite representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad. Como resultado de este análisis, los datos extraídos de una matriz (X) con k-dimensiones, donde k corresponde al número de variables, son reducidos a un espacio definido por unos pocos componentes principales (PCs), capaces de explicar la mayor variabilidad entre las muestras (n).¹²⁹ El primer componente principal (PC1) consistirá en una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas para explicar el máximo de la varianza total del espacio original; el segundo componente principal (PC2) será ortogonal al primero y explicará el máximo de la varianza residual, y así con el resto hasta que la varianza total quede explicada. Como los PCs son ortogonales entre sí, la representación gráfica de los datos en el espacio bidimensional definido por dos PCs (p. ej., PC1 *versus* PC2), proporciona una proyección que se conoce como *gráfico de puntuaciones de las muestras* o *score plot*, donde cada uno de los puntos representa el espectro una

¹²⁷ Dunn, W. B.; Bailey, N. J.; Johnson, H. E. *Analyst* **2005**, *130*, 606-625.

¹²⁸ Ebbels, T. M.; Cavill, R. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *55*, 361-374.

¹²⁹ Halouska, S.; Powers, R. J. *Magn. Reson.* **2006**, *178*, 88-95.

muestra. En el gráfico de puntuaciones, se pueden apreciar las principales agrupaciones y tendencias entre las muestras analizadas (n). De manera análoga, el *gráfico de puntuaciones de las variables* o *loading plot*, define las relaciones entre las k variables que integran la matriz de datos original (X), lo que permite identificar, de forma gráfica, cuáles son las variables (*buckets*) responsables de las tendencias o agrupaciones observadas. La Figura I.38 muestra los gráficos de *score plot* y *loading plot* de un análisis de PCA de los espectros de ^1H -RMN de muestras de exudado de merluza almacenadas en hielo entre 1 y 12 días. El análisis por PCA permite agrupar las muestras en función del tiempo de almacenamiento e indicar los *buckets* más significativos en dicha agrupación.¹³⁰

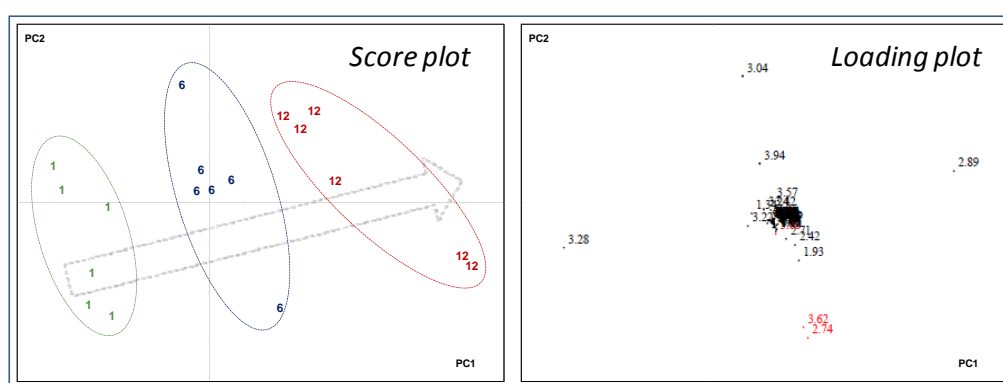


Figura I.38. Diagramas de *scores* y de *loadings* de un análisis de PCA.

I.3.4.2.2. Análisis supervisados.

En el caso de estudios que requieran solventar problemas de clasificación y/o de predicción, será necesaria la aplicación de técnicas multivariantes supervisadas. El objetivo fundamental de estas técnicas es obtener funciones de clasificación a partir de la información proporcionada por las variables analizadas en las muestras pertenecientes a los diferentes grupos que forman el llamado *conjunto de entrenamiento* o *training data set*. Este conjunto de muestras se puede utilizar para confirmar que existe diferencia entre los grupos de clasificación y también para predecir la clasificación de *muestras ciegas* o *test data set*. Es importante subrayar que no existe un único método estadístico supervisado integral adecuado para resolver todos los aspectos que puedan plantearse en el análisis de las matrices estudiadas, sino que para cada

¹³⁰ Castejón, D.; García-García, A. B.; Santos, C.; Escudero, R.; Romero de Ávila, M. D.; Herrera, A.; Cambero M. I. 2015. Análisis metabólico del exudado de merluza (*Merlucius merluccius*). Potencial como indicador de conservación del pescado. VIII CONGRESO CYTA / CESIA 2015. Badajoz.

problema específico se debe seleccionar el método más apropiado. Diversas técnicas como el *Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales* (PLS-DA), su modificación con *corrección ortogonal* (OPLS-DA), el *Análisis Lineal Discriminante* (LDA), los modelos de *Redes Neuronales* o el *Análisis por Vecinos Cercanos* (KNN) han sido utilizadas con éxito en estudios metabólicos.¹³¹ Sin embargo, es muy común, especialmente en espectroscopía, encontrarse en una situación donde el número de variables es más grande que el número de muestras. Estas situaciones generalmente se abordan mediante el empleo de regresión lineal, que es el método de análisis supervisado que se ha empleado en esta memoria.

La regresión de mínimos cuadrados parciales o *Partial least squares regression* (PLS regression) es un método estadístico que estudia la relación entre dos matrices de datos, X e Y, en donde la matriz X contiene los datos extraídos de los espectros de RMN para cada muestra, mientras que la matriz Y contiene información adicional sobre los tipos de muestras analizadas (clase, género, tratamiento de la muestra, etc.). Estos métodos utilizan el conocimiento previo de las muestras para construir modelos estadísticos robustos que permitan, posteriormente, predecir la clase a la que pertenece una muestra sin necesidad de estar previamente clasificada. Se trata de métodos de regresión iterativa que modelan la relación existente entre un grupo de variables independientes y una variable dependiente. En estos modelos, se maximiza la covarianza entre dos grupos de muestras, buscando explicar la separación entre ellos a través de un número definido de variables latentes.¹³² La representación gráfica de estos modelos, de manera similar al PCA, revela el grado de discriminación entre los grupos. Las técnicas quimiométricas supervisadas se han utilizado ampliamente en muestras alimentarias para hacer frente a problemas relacionados con la autenticación de sus orígenes, su variedad, la calidad y así poder clasificar y/o discriminar entre diferentes tipos de muestras.^{133,134,135} La Figura I.39 muestra un ejemplo de la literatura,¹³⁶ donde se

¹³¹ Cubero-Leon, E.; Peñalver, R.; Maquet, A. *Food Res. Int.* **2014**, *60*, 95-107.

¹³² Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2001**, *39*, 1-40.

¹³³ Schievano, E.; Pasini, G.; Cozzi, G.; Mammi, S. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7208-7214.

¹³⁴ Capitani, D.; Mannina, L.; Proietti, N.; Sobolev, A.; Tomassini, A.; Miccheli, A.; Di Cocco, M.; Capuani, G.; De Salvador, R.; Delfini, M. *Talanta* **2010**, *82*, 1826-1838.

¹³⁵ Cubero-León, E.; Peñalver, R.; Maquet, A. *Food Res. Int.* **2014**, *60*, 95-107.

¹³⁶ Zhang, G.; Hailemariam, D.; Dervishi, E.; Deng, Q.; Goldansaz, S. A.; Dunn, S. M.; Ametaj, B. N. *Animals* **2015**, *5*, 717-747.

describe el estudio de muestras de suero procedentes de vacas sanas y enfermas. Como se refleja en la figura existe una agrupación mediante los dos métodos de análisis multivariante empleados (no supervisado, PCA y supervisado, PLS), aunque el método supervisado, como era de esperar, amplifica las diferencias y permite obtener una mejor clasificación.

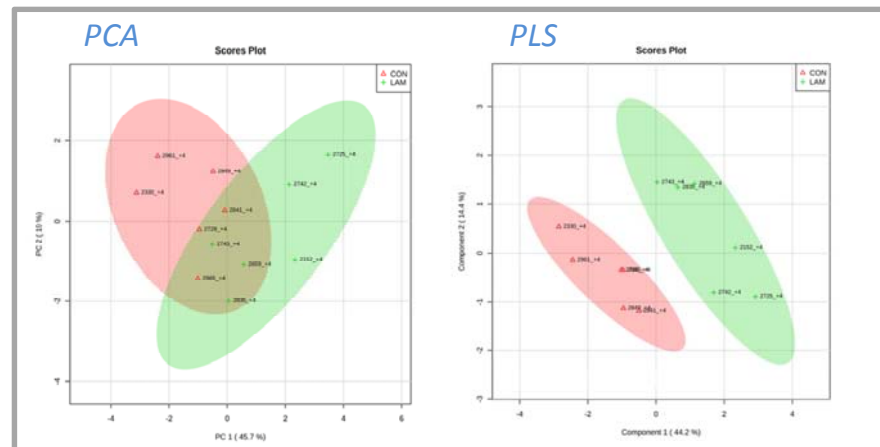


Figura I.39. Análisis de PCA y PLS de muestras de suero procedentes de vacas sanas (rojo) y vacas enfermas (verde).

I.4. Aplicación de la espectroscopía de RMN en el análisis metabolómico de matrices alimentarias.

La RMN es una técnica analítica de contrastada eficacia en diversos campos, que se ha utilizado en los últimos años de forma sistemática en el análisis de alimentos y para su autenticación, incluyendo el control de ciertas Denominaciones de Origen (DOP) e Indicación Geográfica Protegida (IGP). La primera aplicación de la RMN en el área de la Ciencias y Tecnología de los Alimentos se remonta a 1957,¹³⁷ cuando se utilizó la RMN de bajo campo para medir el índice de humedad en muestras alimentarias. Sin embargo, el uso generalizado de la espectroscopía de RMN en este área no comenzó hasta los años 90; este lapso de tiempo fue debido principalmente a las deficiencias en la instrumentación de la RMN y a la complejidad que presenta el estudio de las matrices alimentarias. Desde entonces, se ha producido una explosión en el número de trabajos de investigación, revisiones y libros sobre su aplicación en el estudio de los alimentos.¹³⁸ La Figura I.40 muestra la evolución del número de publicaciones y de referencias derivadas de la utilización de la RMN en Ciencia y Tecnología de los Alimentos desde 1995.¹³⁹

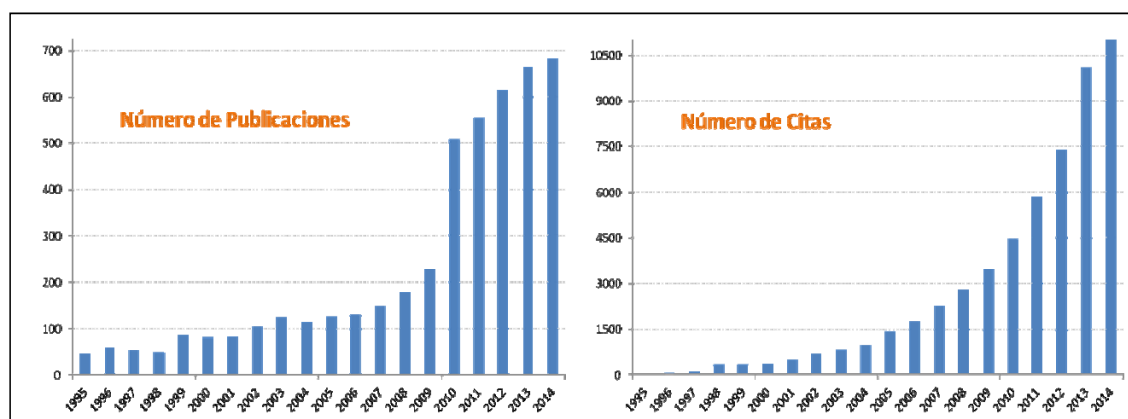


Figure I.40. Evolución del número de publicaciones y citas en Ciencia y Tecnología de Alimentos que han utilizado resonancia magnética nuclear en los últimos 20 años.

Cabe añadir, numerosas comunicaciones orales y escritas presentadas en diversos Congresos y Conferencias nacionales e internacionales. En particular, es de destacar la *International Conferencia on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science*, que se celebra en Europa cada dos años. Este evento

¹³⁷ Conway, T. F.; R. F. Cohee, R. F.; Smith, R. J. *Food Engng.* **1957**, 29, 80-82.

¹³⁸ García-Cañas, V.; Simó, C.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 10150-10159.

¹³⁹ Fuente Thomas Reuters ISI Web of Science® utilizando las palabras clave [NMR] o [MRI] y [food].

internacional se inició en 1992 y permite a los científicos de todo el mundo tener un foro donde presentar las nuevas aplicaciones y desarrollos de la RMN en el campo de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Como prueba de la difusión de esta técnica de análisis, se debe destacar la existencia en la actualidad de diferentes métodos basados en la aplicación de la RMN, que han sido aprobados como métodos oficiales de la Unión Europea (por ejemplo en la detección del fraude en la venta de vino).¹⁴⁰ El auge actual de la RMN en el estudio de matrices alimentarias se debe principalmente a tres factores: (a) la creciente sofisticación e instrumentación de la RMN, lo que facilita su utilización; (b) la creciente necesidad de la industria alimentaria por innovar e incrementar el conocimiento de los alimentos y de los procesos aplicados para un mayor control y seguridad en la producción ; y (c) la necesidad de desarrollar nuevas técnicas analíticas más eficaces en la identificación de distintos componentes y para el control de la calidad de los alimentos, que permita reforzar la legislación vigente.

Los alimentos son sistemas muy complejos y altamente heterogéneos que contienen un gran número de compuestos químicos, cuya composición puede variar considerablemente en función de muchos factores (p. ej., de las prácticas agrícolas, de la técnica de sacrificio, de los procesos industriales empleados, de las condiciones de almacenamiento, etc.). En este sentido, la espectroscopía de RMN 1D, tanto en estado líquido como semisólido, ofrece en un solo experimento una gran cantidad de información estructural cuantificable, como desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento así como la intensidad de señal de los diferentes metabolitos presentes, que es proporcional a su concentración en la muestra. Además, sobre una misma muestra, el investigador puede realizar diferentes experimentos de RMN 1D y analizar diferentes núcleos, tales como ^1H , ^{13}C , ^{31}P o ^{19}F , lo que permite extraer información complementaria para caracterizar su composición y evaluar diferentes factores involucrados en el estudio (p. ej., alimentos bajo distintas condiciones de envasado). Para llevar a cabo un estudio por RMN, la preparación de la muestra es generalmente sencilla y no es necesaria ninguna etapa de extracción.

¹⁴⁰ Official Journal of the European Communities. *Off. J. Eur. Commun.* **1991**; L214, 39-43.

Por otra parte, la espectroscopía de RMN es sensible a los procesos dinámicos, lo que permite la diferenciación entre moléculas o grupos de moléculas con diferente movilidad a través de la medida de los procesos de relajación característicos de la resonancia magnética: la *relajación espín-red* y la *relajación espín-espín*. En los casos en que la complejidad de la muestra sea grande, lo que implica la superposición de señales en los espectros 1D, la espectroscopía de RMN proporciona una gran batería de experimentos 2D, tanto homo como heteronucleares, que pueden resolver dicha complejidad y obtener de ellos la información metabólica. Experimentos como ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^1H -TOCSY, ^1H , ^1H -NOESY o ^1H , ^{13}C -HSQC, que se basan en el acoplamiento que se establece entre los diferentes núcleos magnéticamente activos de la molécula, permiten estudiar la información espectroscópica en dos dimensiones, desentrañando conectividades nucleares ocultas y facilitando la caracterización estructural de las moléculas en el alimento estudiado. Aunque la espectroscopía de RMN es una técnica analítica no destructiva y la recuperación del analito se puede conseguir fácilmente después del análisis, ciertos estudios requieren el examen de los productos alimenticios por medios no invasivos, especialmente buscando su aplicación industrial. En este sentido, la IRM, utilizada ampliamente en medicina, se ha empleado en los últimos años en el análisis no invasivo de alimentos. La IRM muestra la estructura interna de un producto con suficiente resolución espacial y facilita el seguimiento de ciertas moléculas (p. ej., el agua), así como, el establecimiento de interacciones moleculares. Por otra parte, la IRM puede utilizarse para monitorizar los cambios estructurales de los tejidos alimentarios durante su procesado y/o almacenamiento (p. ej., seguir los cambios estructurales asociados al proceso de congelación/descongelación).¹⁴¹

La combinación de la espectroscopía de RMN con el análisis estadístico multivalente constituye una magnífica herramienta para maximizar la extracción de la información presente en los complejos datos espectrales. Esta metodología, conocida como *metabolómica*, no requiere necesariamente la identificación de las señales individuales del espectro, sino que puede centrarse en la búsqueda de aquellas diferencias espectrales que permitan identificar de

¹⁴¹ Voda, A.; Homan, N.; Witek, M.; Duijster, A.; van Dalen, G.; van der Sman, R.; Nijssse, J.; van Vliet, L.; Van As, H.; van Duynhoven, J. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 687-693.

manera inequívoca la presencia de metabolitos o marcadores del proceso en estudio. Las técnicas de reconocimiento de patrones (supervisados o no supervisados), se pueden utilizar para mapear los espectros de RMN de un gran número de muestras y localizar aquellas huellas espectrales que reflejen cambios metabólicos, o bien perfiles particulares, que permitan definir grupos con características diferentes.

En los últimos años se han desarrollado nuevos equipos con mayores prestaciones, que incluyen campos magnéticos más intensos (de hasta 23,5 T) y sondas de radiofrecuencia más sensibles, con lo que se ha solventado la baja sensibilidad y el alto coste de la espectroscopía de RMN en sus inicios. Por otra parte, los avances en los programas informáticos y las innovaciones en la automatización permiten el análisis de un gran número de muestras, reduciendo el tiempo experimental a unos pocos minutos, incluso para núcleos poco sensibles (p. ej., ^{13}C , ^{15}N).

En las siguientes secciones se hace una breve referencia a las principales aplicaciones de la RMN para el estudio de la composición el control de la calidad y la monitorización del procesado y almacenamiento de los alimentos, así como de los nuevos avances producidos en la automatización de esta técnica de análisis.

Contrariamente a lo que sucede en otras técnicas de análisis, la espectroscopía de RMN no ha contado con un alto grado de automatización. Lo habitual es que el usuario de la RMN sitúe las muestras de forma manual en el espectrómetro. Sin embargo, en los últimos años, y debido sobre todo a la creciente demanda de estudios metabolómicos, se han producido notables mejoras de la técnica para incrementar su eficacia. El primer paso fue el desarrollo de inyectores automáticos en los que los tubos de RMN se disponen en un carrusel. Un brazo introduce y retira las muestras en el equipo de forma que el sistema puede funcionar en continuo (24 horas al día), sin la necesidad de un operador. Esta forma de proceder confiere a la espectroscopía de RMN un gran potencial para asumir el análisis de un número considerable de muestras. Por otra parte, la combinación de la RMN con diversas técnicas de análisis estadístico, constituye una herramienta muy versátil para tratar los distintos desafíos a los que se enfrenta la industria alimentaria y los que han de ocuparse

del control de calidad. Cabe esperar que en un futuro próximo la RMN sea una pieza fundamental para la identificación de posibles contaminaciones alimentarias y la detección de fraudes en el etiquetado. Un ejemplo exitoso de la aplicación de esta metodología en el estudio de zumos de frutas es el equipo *Bruker JuiceScreener™* para *SGF Profiling™*.^{142,143} Este equipamiento, dotado de inyector automático, puede realizar la preparación de la muestra, procesar los datos espectrales obtenidos y proporcionar un informe analítico del zumo estudiado (Figura I.41). Este análisis se fundamenta sobre una amplia base de datos (contiene espectros de referencia de más de 6.000 zumos), que permite identificar valores anómalos de los diferentes metabolitos presentes en los zumos comerciales y a partir de ahí, la obtención de las conclusiones oportunas acerca de la calidad, el origen y la seguridad del producto. Equipos similares se encuentran actualmente en desarrollo para el análisis automático de muestras de vino y miel. Este tipo de ejemplos ponen de manifiesto el potencial de la espectroscopía de RMN para convertirse en una técnica de rutina tanto en los laboratorios de análisis y control como en la propia industria alimentaria (Figura I.41).

Compound	Conc. [mg/l]	Flag	Compound	Conc. [mg/l]	Flag
ethanol	<10	○	sucrose	31.000	●
methanol	N/Q	○	a-D-glucose	10.800	○
malicacid	1.500	●	b-D-glucose	12.500	○
citricacid	10.700	●	D-glucose	23.400	●
quinicacid	N/Q	○	D-fructose	27.300	●
citramalic acid	N/Q	○	alanine	66	●↓
lacticacid	<5	●	proline	956	○
fumaricacid	<5	●	5-HMF	18	●↑
succinicacid	21	○	phlorin	23	○
benzoicacid	<10	●	α-D-galacturonicacid	52	○
formic acid	<5	●	chlorogenicacid	<5	○
D-gluconic acid	N/Q	○	acetaldehyde	N/Q	○

Figura I.41. Resultados de la cuantificación en el análisis automático de un zumo de naranja mediante ^1H -RMN. Las etiquetas de colores indican concordancia o desviación frente a los intervalos de referencia.

¹⁴² Spraul, M.; Schütz, B.; Rinke, P.; Koswig, S.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Mörtter, M.; Fang, F.; Marx, U.; Minoja, A. *Nutrients* **2009**, *1*, 148-155.

¹⁴³ <https://www.bruker.com/products/mr/nmr/foodscreeener/juice-profiling/overview.html>

I.4.1. Aplicación en el estudio de la composición de los alimentos.

Tradicionalmente, el análisis de los componentes de un alimento implica su identificación y clasificación en categorías muy amplias tales como proteínas, grasas, hidratos de carbono, fibras, vitaminas, oligoelementos y/o cenizas. Sin embargo, con la llegada de la metabolómica, los alimentos están siendo analizados con mayor detalle químico, siendo cientos o incluso miles los compuestos detectados y/o identificados.¹⁴⁴ El potencial para “deconstruir” o desglosar analíticamente los alimentos en sus componentes químicos, ofrece a los investigadores en Ciencia y Tecnología de los Alimentos una oportunidad única para entender los detalles moleculares que confieren a ciertos alimentos y bebidas su sabor, textura, aroma o color únicos. Otra oportunidad atractiva para los científicos es identificar con precisión los ingredientes bioactivos en alimentos y poder entender mejor las consecuencias de su potencial beneficioso (o perjudicial).¹⁴⁵ Desde el punto de vista de un investigador en metabolómica, la mayoría de los alimentos están constituidos por una mezcla compleja de varios metabolitos y aditivos químicos en una matriz sólida, semisólida o líquida. Algunos alimentos comerciales simplemente presentan 10-20 productos químicos diferentes (zumos artificiales, refrescos o aceites vegetales refinados), mientras que otros contienen cientos de compuestos (leche o queso) y otros pueden tener incluso miles (frutas, carnes y alimentos más elaborados). Para entender la amplitud del número y la diversidad de compuestos químicos presentes en los alimentos pueden considerarse los siguientes datos recopilados de distintos trabajos: (1) el metaboloma humano (que sería similar al que puede encontrarse en la mayoría de las carnes rojas) contiene más de 3.000 metabolitos endógenos detectables (>1 pM);¹⁴⁶ (2) el metaboloma de la leche contiene, por ejemplo, más de 200 oligosacáridos diferentes;¹⁴⁷ (3) en el metaboloma de una planta comestible pueden encontrarse más de 10.000 compuestos detectables diferentes, de los cuales más de 2.000 son nutrientes y al menos 8.000 son

¹⁴⁴ Wishart, D. S.; Jewison, T.; Guo, A. C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Arndt, D.; Xia, J.; Liu, P.; Yallou, F.; Bjorn Dahl, T.; Perez-Pineiro, R.; Eisner, R.; Allen, F.; Neveu, V.; Greiner, R.; Scalbert, A. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D801-7.

¹⁴⁵ Wishart, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 482-493.

¹⁴⁶ Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D. et. al. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, D521-6.

¹⁴⁷ Ninonuevo, M. R.; Park, Y.; Yin, H.; Zhang, J.; Ward, R. E.; Clowers, B. H.; German, J. B.; Freeman, S. L.; Killeen, K.; Grimm, R. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7471-7480.

compuestos fitoquímicos no nutrientes;¹⁴⁸ cabe añadir que (4) la FDA (*Food and Drug Administration*) de los EE.UU considera una lista de más de 3.000 aditivos alimentarios autorizados (de los cuales 2.000 son sustancias químicas bien definidas), que pueden encontrarse en los alimentos procesados. En conjunto, en el denominado "*metaboloma nutricional*" o simplemente "*metaboloma de los alimentos*" se engloba una colección con 15.000 componentes de los alimentos (tanto nutrientes como no nutrientes, naturales y artificiales).¹⁴⁹

El metaboloma de los alimentos se caracteriza no sólo por la considerable diversidad química (más de 100 tipos de compuestos químicos) de los compuestos detectados, sino también por la amplia variabilidad cuantitativa con la que se encuentran en las matrices alimentarias. De hecho, la concentración de estos compuestos para cualquier alimento analizado, puede variar desde femtomolar (vitaminas, aditivos alimentarios y ciertos fitoquímicos) a milimolar (azúcares, ácidos grasos o sales). La detección, identificación y cuantificación de todos estos compuestos, que difieren entre sí en rangos tan enormes de concentración (billones de veces), representa un gran desafío técnico y computacional. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías así como el de las librerías espectrales y de las bases de datos metabolómicas, han permitido avanzar en el conocimiento de los alimentos con las consiguientes ventajas para el control de los problemas de salud pública asociados a la distribución de alimentos y el entendimiento de los procesos que causan ciertas enfermedades. Análisis heretoespectroscópicos, que utilizan la combinación de la RMN con la cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) y otras técnicas cromatográficas, han conseguido identificar hasta 100 componentes fitoquímicos o 200 hidratos de carbono en muestras de frutas, hortalizas y bebidas seleccionadas.^{150,151} El empleo combinado de tecnologías de separación y detección permite analizar una gama mucho más amplia de metabolitos, donde la RMN es especialmente útil en la detección de metabolitos polares y la EM-CG o EM-CL en los no polares o semipolares. Vale la pena destacar que la mayoría de los estudios

¹⁴⁸ Ehrman, T. M.; Barlow, D. J.; Hylands, P. J. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 254-263.

¹⁴⁹ Gibney, M. J.; Walsh, M.; Brennan, L.; Roche, H. M.; German, B.; van Ommen, B. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 497-503.

¹⁵⁰ Ye, M.; Han, J.; Chen, H.; Zheng, J.; Guo, D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 82-91.

¹⁵¹ Ninonuevo, M. R.; Park, Y.; Yin, H.; Zhang, J.; Ward, R. E.; Clowers, B. H.; German, J. B.; Freeman, S. L.; Killeen, K.; Grimm, R. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7471-7480.

metabolómicos publicados en el campo de los alimentos, hasta la fecha, se han centrado en muestras líquidas o extractos y no en el análisis de la matriz sólida. Esto se debe principalmente a que la mayoría de los nutrientes pueden ser fácilmente extraídos mediante procedimientos adecuados y que la mayoría de las tecnologías de detección de compuestos químicos están optimizadas para trabajar con muestras líquidas.

Recientes estudios en leche entera han demostrado que la espectroscopía de RMN permite, de forma rápida y no destructiva, la identificación y cuantificación de casi una docena de ácidos grasos, azúcares libres, acetilcarbohidratos y otros metabolitos de bajo peso molecular.¹⁵² Dada la velocidad y la precisión con la que se realizaron estos análisis, cabe pensar que en un futuro próximo, la espectroscopía de RMN pueda reemplazar a las técnicas utilizadas tradicionalmente para caracterizar muestras lácteas. Estudios en tomate (pulpa y zumo), mediante CL-EM y RMN han demostrado que estas dos técnicas pueden revelar información complementaria sobre sus componentes.^{153,154} El análisis mediante CL-EM, permitió identificar (más de 60) compuestos no polares y metabolitos secundarios como polifenoles, flavoglucósidos y alcaloides. Por otro lado, el uso de la RMN puso de manifiesto la bondad de esta técnica para la identificación y la cuantificación de los isómeros de licopeno y los carotenoides, que no pudieron diferenciarse por CL-EM. En anteriores estudios de tomate mediante RMN se detectaron los compuestos más abundantes (azúcares, glucósidos flavonoides, aminoácidos y ácidos orgánicos).¹⁵⁵ Las variaciones en algunos de estos componentes fitoquímicos, se han relacionado con el proceso de maduración y con las diferencias en sabor, aroma y color de los diferentes tipos de tomates, así como con su potencial anticancerígeno frente a tumores de próstata.¹⁵⁶

Con el avance del análisis metabolómico sin duda, se producirá un incremento paralelo de su empleo en el estudio de los alimentos así como en sus aplicaciones para conocer el efecto de diferentes procesos y las consecuencias de

¹⁵² Hu, F.; Furihata, K.; Kato, Y.; Tanokura, M. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4307-4311.

¹⁵³ Moco, S.; Bino, R. J.; Vorst, O.; Verhoeven, H. A.; de Groot, J.; van Beek, T. A.; Vervoort, J.; de Vos, C. H. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 1205-1218.

¹⁵⁴ Tiziani, S.; Schwartz, S. J.; Vodovotz, Y. J. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6094-6100.

¹⁵⁵ Le Gall, G.; Colquhoun, I. J.; Davis, A. L.; Collins, G. J.; Verhoeven, M. E. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2447-2456.

¹⁵⁶ Tiziani, S.; Schwartz, S. J.; Vodovotz, Y. J. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6094-6100.

aplicar unos u otros (p. ej., la fritura *versus* el horneado o la cocción; la congelación frente a la deshidratación o el ahumado). El análisis metabólico también ofrece información que podría utilizarse para establecer medidas de mejora de la producción agrícola y ganadera. Algunas de las aplicaciones de esta metodología se desarrollarán en los siguientes apartados.

1.4.2. Aplicación en el control de la seguridad y calidad alimentaria.

En los últimos años ha aumentado la necesidad de especificar los requisitos de autenticidad y calidad que deben satisfacer los productos alimentarios.¹⁵⁷ En el campo del control alimentario han surgido nuevos términos, incluidos en un glosario específico, en el que cabe destacar vocablos, ya habituales, como *trazabilidad*, para indicar la capacidad de rastrear y seguir un alimento a través de todas las etapas de su producción. Se habla de *autenticidad* para referirse a la veracidad del etiquetado, es decir, si el alimento adquiridor por el consumidor representa fielmente lo que se indica en la etiqueta del producto. La *adulteración* o el fraude en el etiquetado de los alimentos se produce por distintas vías, desde la simple adición de agua, u otros productos no declarados (generalmente más baratos), hasta la declaración de una cantidad incorrecta de un ingrediente (que generalmente le confiere un valor añadido al producto), o falseado el origen de los ingredientes, (origen animal o vegetal y procedencia. La protección de los productos alimenticios de alta calidad frente a otros de la misma designación comercial, pero de menor calidad, es necesaria para la salvaguardia del consumidor y evitar la competencia desleal. Un campo donde el control de la autenticidad toma especial relevancia es el de la comercialización de los productos pertenecientes a una DOP o IGP. Ambas calificaciones han surgido para asegurar la reputación de ciertos alimentos nacionales o regionales y garantizar que cumplen las condiciones impuestas por los Consejos Reguladores que controlan cada DOP o IGP. La Unión Europea ha promulgado un reglamento que establece las normas de protección para los alimentos de alta calidad DOP e IGP. La industria alimentaria tiene que mantener una producción homogénea, con las mismas características químicas y sensoriales, y de una determinada calidad, para lo cual requiere de herramientas analíticas eficaces para la verificación de la

¹⁵⁷ Trimigno, A.; Maricola, F. C.; Dellarosa, N.; Picone, G.; Laghi, L. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *4*, 99-104.

calidad de sus productos y confirmar su autenticidad; ambos aspectos son igualmente útiles para quienes se ocupan de la inspección y control de los alimentos.¹⁵⁸

En esta línea, la espectroscopía de RMN, junto con el análisis multivariante, se ha empleado con éxito en la detección de la adulteración de zumos, práctica relativamente común en la industria, que es muy difícil de detectar mediante el análisis del color o del sabor. El método de análisis, basado en RMN, desarrollado por Cuny et al. (2007), para la detección y prevención de este tipo de adulteración, permitió clasificar correctamente el 98% de los zumos analizados y reducir a menos de la mitad los tiempos empleados con respecto a los métodos cromatográficos estándar.¹⁵⁹

La espectroscopía de RMN también se ha utilizado con éxito en el seguimiento de la calidad, y la evaluación de distintos centros de producción de una misma marca de cerveza.¹⁶⁰ Generalmente, las grandes multinacionales elaboran la cerveza en diversas factorías con ubicaciones geográficas muy distintas. Teniendo en cuenta el requerimiento de elaborar en todos los lugares un producto homogéneo, con gusto y características similares, es necesario disponer de herramientas de estudio que permitan el análisis profundo de la estructura molecular de sus componentes. Así, en un trabajo realizado por Almeida et al. se utilizó la espectroscopía de RMN en combinación con el análisis de componentes principales, para evaluar la repercusión del lugar de producción en las características de la misma bebida, encontrando que era posible determinar fácilmente el origen de la cerveza en base a su contenido de ácido láctico, ácido pirúvico, dextranos, adenosina, inosina, uridina, tirosina y 2-feniletanol. La cuantificación de estos compuestos también permitió a los autores identificar el centro de producción con mayor variabilidad en la composición de la cerveza producida y que por tanto presentaba un nivel inferior del control de calidad. Este ejemplo sería fácilmente extrapolable a otras empresas del sector alimentario (como la implicada en la elaboración de refrescos, bebidas alcohólicas o aceites comestibles).

¹⁵⁸ Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, 66, 1-39

¹⁵⁹ Cuny, M.; Le Gall, G.; Colquhoun, I.; Lees, M.; Rutledge, D. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 597, 203-213.

¹⁶⁰ Almeida, C.; Duarte, I. F.; Barros, A.; Rodrigues, J.; Spraul, M.; Gil, A. M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 700-706.

Otro caso de utilización de la RMN metabolómica en el control de la calidad y seguridad alimentaria es el descrito por Mazzei et al. respecto a la producción de *Mozzarella di Bufala Campana* (MBC),¹⁶¹ que se encuentra protegida bajo la correspondiente DOP. Su producción posee una alta relevancia en la economía agroalimentaria de la región de Campania (Italia). Este trabajo reveló que la espectroscopía de ¹H-RMN/HRMAS permite la rápida caracterización del perfil metabólico de las muestras de MBC intactas y su clasificación tanto por su origen geográfico como por su frescura.

1.4.3. Aplicación en el procesado y conservación de los alimentos.

Un alimento ideal sería el que armonizara un aporte equilibrado de nutrientes con las características sensoriales que satisficieran las demandas de un consumidor, no siempre unificado y cuyos gustos dependen de múltiples factores. La elaboración de este hipotético alimento requeriría un proceso de elaboración optimizado y controlado, lo que supone abordar diversos retos,¹⁶² no siempre fáciles de alcanzar dado que el conocimiento en muchos campos de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos es todavía limitado. Las tecnologías aplicadas en la conservación de los alimentos tienen un alto impacto sobre las vías metabólicas, tanto de los alimentos como de la microbiota que los contamina. El efecto sobre el perfil metabólico del alimento puede detectarse mediante la RMN metabolómica. Esta metodología permitiría monitorizar la alteración de los alimentos durante el almacenamiento y de esta forma, establecerse los tiempos de comercialización con óptimas características nutricionales y sensoriales.¹⁶³

En los últimos años, se han realizado diversos estudios para profundizar en los fenómenos químicos y microbiológicos que se producen en los alimentos durante su almacenamiento, con especial énfasis en los procesos de degradación. En este contexto, se han estudiado distintos tipos de alimentos: pescado,¹⁶⁴ carne,¹⁶⁵ o vegetales,¹⁶⁶ y se ha tenido en cuenta el tiempo y las

¹⁶¹ Mazzei, P.; Piccolo, A. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1620-1627.

¹⁶² López-Sánchez, P.; De Vos, R.; Jonker, H.; Mumm, R.; Hall, R.; Bialek, L.; Leenman, R.; Strassburg, K.; Vreeken, R.; Hankemeier, T. *Food Chem.* **2015**, *168*, 348-355.

¹⁶³ Trimigno, A.; Marincola, F. C.; Dellarosa, N.; Picone, G.; Laghi, L. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *4*, 99-104.

¹⁶⁴ Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Capitani, D.; Iaffaldano, N.; Rosato, M. P.; Ragni, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; D'Amico, I.; Coppola, R. *Talanta* **2008**, *77*, 433-444.

¹⁶⁵ Graham, S. F.; Kennedy, T.; Chevallier, O.; Gordon, A.; Farmer, L.; Elliott, C.; Moss, B. *Metabolomics* **2010**, *6*, 395-404.

condiciones del almacenamiento. Un ejemplo de esto último es el trabajo de Ercolini et al., en el que se evaluó el utilización de atmósferas modificadas en la conservación de muestras cárnicas.¹⁶⁷

La RMN se ha utilizado también para estudiar el efecto de las etapas del proceso de elaboración industrial (tratamientos mecánicos y térmicos) en la composición de purés elaborados con brócoli, tomate y zanahoria. Los resultados indicaron que el orden de ejecución de las operaciones básicas aplicadas (pelar, picar y triturar) y el tratamiento térmico, son claves en la composición metabolómica y en la calidad final del producto.¹⁶⁸ Recientemente se ha publicado una revisión que ofrece una visión general de la aplicación de la RMN en el análisis del procesado del pescado. En este estudio monográfico se muestra la capacidad de esta técnica como herramienta especialmente útil para la optimización del procesado de pescado, el consiguiente incremento de su calidad y para corroborar la información de su etiquetado.¹⁶⁹

El trabajo de Choi et al. es otro ejemplo de aplicación de la RMN metabolómica al procesado de alimentos. En este estudio se recurrió a herramientas quimiométricas para monitorizar el proceso de elaboración de *cheonggukjang* (bebida fermentada de soja y arroz). Los espectros de RMN permitieron, a través de un análisis de PCA, la clasificación de la bebida en función del tiempo de fermentación.¹⁷⁰

La demanda de alimentos mínimamente procesados está potenciando la aplicación de tratamientos de conservación no térmicos que produzcan la reducción de la microbiota contaminante y/o la inactivación de las enzimas implicadas en su deterioro, sin que se afecten de forma manifiesta las características organolépticas y el valor nutritivo. Entre estas tecnologías cabe citar la irradiación, el uso de altas presiones o la aplicación de plasma de frío.¹⁷¹

¹⁶⁶ Kortessniemi, M.; Vuorinen, A. L.; Sinkkonen, J.; Yang, B.; Rajala, A.; Kallio, H. *Food Chem.* **2015**, *172*, 63-70.

¹⁶⁷ Ercolini, D.; Ferrocino, I.; Nasi, A.; Ndagijimana, M.; Vernocchi, P.; La Storia, A.; Laghi, L.; Mauriello, G.; Guerzoni, M. E.; Villani, F. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7372-7381.

¹⁶⁸ López-Sánchez, P.; De Vos, R.; Jonker, H.; Mumm, R.; Hall, R.; Bialek, L.; Leenman, R.; Strassburg, K.; Vreeken, R.; Hankemeier, T. *Food Chem.* **2015**, *168*, 348-355.

¹⁶⁹ Erikson, U.; Standal, I. B.; Aursand, I. G.; Veliyulin, E.; Aursand, M. Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, 471-480.

¹⁷⁰ Choi, H.; Yoon, J.; Kim, Y.; Kwon, D. Y. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 263-266.

¹⁷¹ Tappi, S.; Berardinelli, A.; Ragni, L.; Dalla Rosa, M.; Guarnieri, A.; Rocculi, P. *Innov. Food Sci. Emerg.* **2014**, *21*, 114-122.

La RMN metabolómica también se ha utilizado en este campo para profundizar en el análisis del efecto en distintos alimentos de estas nuevas tecnologías de mínimo impacto; un ejemplo de esta línea de investigación puede ser el trabajo descrito por Zanardi et al. en carne tratada con radiaciones ionizantes.¹⁷²

1.5. Retos en la aplicación de la RMN en el estudio de alimentos.

Como ya se ha mencionado, la RMN metabolómica constituye una metodología con un elevado potencial de aplicación en múltiples áreas de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, incluyendo el análisis de sus componentes, valoraciones nutricionales, evaluación de la calidad, estimación de la autenticidad, control y monitorización de procesos, estudios de intervención, etc. Sin embargo, el impacto de la RMN y de la metabolómica se encuentra todavía limitado por diversos factores, entre los que cabe mencionar:

- **Tecnológicos.** En cuanto a la instrumentación, es evidente que la RMN ha avanzado mucho en los últimos años, lo que ha permitido disminuir el límite de detección así como disponer comercialmente de equipos que permiten la completa automatización de análisis concretos (zumos, vinos, etc.), o incluso equipos de bajo campo de sobremesa muy útiles para aplicaciones en la industria. Pese a ello, son necesarias mejoras que permitan la detección de más metabolitos, una tecnología de cuantificación más robusta y poder desarrollar un análisis más automatizado e integral. Si bien se han hecho avances prometedores, éstos no son generales y únicamente son de aplicación en estudios concretos o en centros singulares. Estos hechos son particularmente importantes en los estudios de alimentación y nutrición. Son necesarios nuevos avances en el desarrollo de técnicas acopladas capaces de detectar un mayor número de metabolitos, ya que las técnicas actuales sólo son capaces de detectar uno de cada diez compuestos del metaboloma de los alimentos.

- **Bases de datos.** Es necesario desarrollar y hacer públicos muchos más espectros de referencia y bases de datos de metabolitos que incluyan componentes de los alimentos y productos fitoquímicos. La existencia de estas referencias permitiría la identificación y la cuantificación rutinaria de los

¹⁷² Zanardi, E.; Caligiani, A.; Palla, L.; Mariani, M.; Ghidini, S.; Di Ciccio, P. A.; Palla, G.; Ianieri, A. *Meat Sci.* **2015**, *103*, 83-89.

compuestos nutricionalmente más relevantes. En este sentido, se está realizando un amplio esfuerzo, similar al que se llevó a cabo para realizar la descripción del metaboloma en el ser humano www.hmdb.ca,¹⁷³ para completar y catalogar el “metaboloma de los alimentos” www.foodb.ca.¹⁷⁴ *FooDB* es una base de datos sobre los componentes de los alimentos, su química y su biología, que está en desarrollo desde el año 2009. Cuando se haya completado, será el recurso más extenso sobre la composición de alimentos en el mundo.

- **Formación.** La espectroscopía de RMN es quizás una de las técnicas de análisis menos conocidas entre los titulados en el campo alimentario (Agrónomos, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Nutricionistas, etc.). Facilitar el conocimiento de la extensión y del potencial de esta técnica, incrementaría sin duda su aplicación en el estudio de alimentos y de forma paralela el desarrollo de nuevos equipos y aplicaciones adaptadas a este fin.

- **Estandarización y normalización.** Aunque en casos muy concretos, como el análisis de muestras de orina (el biofluido más estudiado con diferencia mediante RMN), donde los protocolos para la adquisición y el procesamiento de los datos de RMN han sido normalizados. Lo habitual en los estudios por espectroscopía de RMN, es que cada grupo utilice unas condiciones diferentes de toma, preparación de muestra, adquisición y procesamiento de los datos. Este hecho dificulta la comparación de los resultados obtenidos en los diferentes grupos de investigación. Por ello, hay grupos que proponen una normalización en los protocolos desde la selección de la muestra, su colección, su almacenamiento y su preparación, especialmente en aquellos estudios que emplean la RMN Metabolómica, incluyendo su adquisición y procesamiento.¹⁷⁵ Esta falta de consenso actual puede dar lugar a interpretaciones incorrectas de los datos espectroscópicos y en general a una falta de reproducibilidad entre laboratorios. Los métodos y desarrollos futuros deberían permitir una

¹⁷³ Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M. A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D. D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G. E.; Macinnis, G. D.; Weljie, A. M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R.; Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B. D.; Vogel, H. J.; Querengesser, L. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, D521-6.

¹⁷⁴ Scalbert, A.; Andrés-Lacueva, C.; Arita, M.; Kroon, P.; Manach, C.; Urpi-Sarda, M.; Wishart, D. J. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4331-4348.

¹⁷⁵ Emwas, A.; Luchinat, C.; Turano, P.; Tenori, L.; Roy, R.; Salek, R. M.; Ryan, D.; Merzaban, J. S.; Kaddurah-Daouk, R.; Zeri, A. C. *Metabolomics* **2014**, 1-23.

comparación más fiable de los resultados generados gracias a la adopción y/o estandarización de los procedimientos propuestos.

- **Investigación Coordinada.** La comunidad científica prevé avances como consecuencia de los desarrollos de las técnicas ómicas que deberían ir dirigidos a la creación de redes de colaboración entre investigadores. De hecho, existe una necesidad evidente de aumentar el nivel de colaboración dentro de los expertos de las diferentes disciplinas, tales como Bioinformática, Quimiometría, Química Analítica, Bioquímica o Tecnología de los Alimentos. Este trabajo en red permitirá solventar algunas de las deficiencias descritas anteriormente en este punto, pues seguramente ayudará a generar información más accesible y fiable y la definición de procedimientos y protocolos estándar para generar una perspectiva común y unos datos más robustos.

Durante la última década, la espectroscopía de RMN ha encontrado una mayor aplicación en el análisis de las matrices alimentarias tanto en el mundo académico como industrial e incluso a nivel regulatorio. Seguramente los primeros experimentos en los que se aplicó la RMN en el estudio de los alimentos, fueron fruto de la curiosidad de los expertos en RMN ya que era mucho más fácil encontrar alimentos en las proximidades de los espectroscopistas, que espectrómetros de RMN cerca de los estudiosos de los alimentos. En la actualidad, cuando la aplicación de la espectroscopía de RMN en el análisis de alimentos parece por fin haber llegado para quedarse, sigue siendo de vital importancia la implicación y la coordinación entre los científicos de alimentos, con un profundo conocimiento de las matrices alimentarias, y los expertos en RMN para así poder coordinar el diseño y la aplicación de los experimentos de RMN a problemas analíticos concretos. La necesidad de una Tesis que pueda servir como una herramienta de introducción a la RMN para los investigadores de alimentos es, pues, clara y presente. Esperamos haber tenido éxito, al menos parcialmente, en cubrir este vacío con nuestra contribución.

II. OBJETIVOS

Objetivos

En el marco de antecedentes mencionado a lo largo de la introducción de esta memoria, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido aplicar la espectroscopía de RMN, junto con el análisis metabolómico, al estudio de alimentos tratando de progresar en la necesaria optimización y estandarización de los experimentos tanto en lo referente a la toma de muestra, su preparación, como en la adquisición de los datos espectroscópicos y su posterior procesado.

Para desarrollar este objetivo, se abordó el estudio de diferentes matrices alimentarias (sólidas y líquidas) y su evolución durante distintos procesos de la cadena de producción y distribución hasta llegar al consumidor. Se ha tratado de establecer el potencial de la RMN metabolómica para la monitorización de tratamientos aplicados en la Industria Alimentaria como herramienta en el control de la calidad y seguridad alimentaria. En el trabajo realizado se ha recurrido a distintas técnicas de la espectroscopía de RMN para proporcionar pautas experimentales que acerquen la aplicación de esta metodología al marco alimentario.

Las investigaciones recogidas en esta Tesis Doctoral se han desarrollado en un marco amplio de trabajo en el que se han estudiado distintos aceites comestibles, y miosistemas (carne y pescado) y se han desarrollado varias etapas en las que se afrontaron los siguientes objetivos parciales:

1. Optimizar el análisis de ^1H -RMN de aceites comestibles para obtener la composición de ácidos grasos de forma precisa y rápida.
2. Automatizar el análisis de la composición de ácidos grasos en aceites vegetales mediante ^1H -RMN a bajo campo.
3. Monitorizar el proceso de fritura en diferentes aceites vegetales empleando RMN y REE.
4. Desarrollar y optimizar el estudio de muestras integra de salmón ahumado mediante ^1H -RMN/HRMAS, evaluando la información espectral obtenida.

5. Monitorizar a través de ^1H -RMN el proceso de degradación de muestras de pescado durante el almacenamiento.

6. Estudiar el efecto de la irradiación (radiación Beta) mediante RMN en matrices alimentarias. Evaluar el efecto conservador y la posible alteración de la muestra.

7. Desarrollar y optimizar el estudio de diferentes matrices cárnicas mediante RMN para monitorizar el proceso de maduración de la carne.

En resumen, el trabajo se planificó para abordar objetivos de carácter científico y técnico. Por una parte, se pretendía incrementar la asignación de señales de la espectroscopía de RMN a distintos componentes de los alimentos. Este perfil de trabajo permitiría no sólo avanzar en el análisis metabolómico de alimentos, sino también en otras áreas del conocimiento donde se estudian, desde otras vertientes, los mismos tejidos y componentes. De otro lado, se consideró la necesidad de optimizar y automatizar el análisis de RMN, el empleo directo de matrices sólidas o de sustratos que no requieren ninguna manipulación o preparación. En conjunto, de conseguirse, sería un importante avance para la aplicación de las técnicas de RMN que podría transferirse al amplio sector alimentario, desde la producción hasta el implicado en el control y seguridad alimentaria.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE RMN AL ESTUDIO DE ACEITES VEGETALES.



III.1.1: EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES COMESTIBLES MEDIANTE ^1H -RMN.

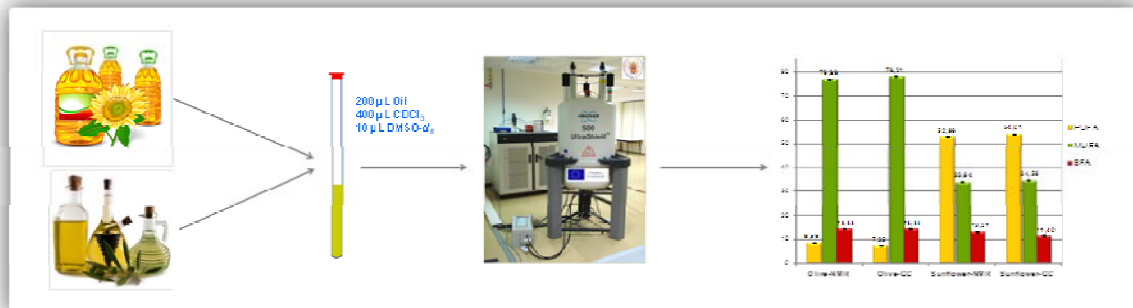
III.1.1: EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES COMESTIBLES MEDIANTE ^1H -RMN.

En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos que utilizan la RMN para determinar la composición de los ácidos grasos en aceites comestibles. Aunque en general los resultados obtenidos son satisfactorios, estos métodos requieren condiciones específicas de análisis e implican habitualmente largos tiempos de adquisición. Además, cada método emplea diferentes notaciones tanto para identificar las señales de los ácidos grasos en el espectro de ^1H -RMN, como para describir las expresiones matemáticas que se utilizan para calcular la composición de ácidos grasos. Considerando todo lo anterior, resulta complicado el poder comparar los diferentes métodos descritos. Con el objetivo de establecer unas condiciones de análisis estándar y poder evaluar comparativamente los métodos de cálculo descritos, en el presente estudio se ha optimizado el análisis de los aceites comestibles mediante ^1H -RMN. Para llevar a cabo esta optimización y poner a prueba la bondad del método, se seleccionaron tres aceites caracterizados por presentar diferentes composiciones de ácidos grasos: mayoritariamente ácido oleico (aceite de oliva), mayoritariamente ácido linoleico (aceite de girasol) y mayoritariamente ácido linolénico (aceite de linaza). Con este proceder se intentó que los resultados obtenidos fueran extrapolables al análisis de cualquier aceite vegetal. Una vez optimizada la adquisición de los ácidos grasos mediante ^1H -RMN, el procedimiento optimizado se utilizó para evaluar los métodos que permiten obtener la composición de los ácidos grasos a través de los datos espectrales. Los resultados se compararon con los obtenidos por cromatografía de gases (GC-FID) como método de referencia. Gracias a la optimización realizada, fue posible obtener en menos de 1 minuto la composición de ácidos grasos (porcentaje de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) con la misma precisión y mejor reproducibilidad que por GC-FID, evitando tediosos procesos de extracción y derivatización. A partir de la evaluación de los distintos métodos utilizados para obtener la composición de ácidos grasos mediante ^1H -RMN, se pudieron seleccionar las aproximaciones y expresiones matemáticas más adecuadas para el cálculo.

La completa asignación del espectro de ^1H -RMN, permite además llevar a cabo una rápida evaluación de los componentes minoritarios, lo que aporta una

valiosa información adicional sobre la composición, la calidad y la conservación del aceite analizado y confiere al espectro de ^1H -RMN, el carácter de huella dactilar del aceite.

La metodología propuesta permite llevar a cabo el análisis de un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo. Teniendo en cuenta la nueva legislación referente al etiquetado nutricional en la Unión Europea (Reglamento 1169/2011), este método sería una buena alternativa de análisis, rápida y precisa así como para el control de calidad de los aceites comestibles, especialmente si se consigue la completa automatización del análisis y el procesamiento de los datos de RMN.



Trabajo 1

”Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by ^1H -NMR”

Food Anal. Method. **2014**, 7, 1285-1297

Parte de este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en el “*Euro Food Chem XVI - Translating Food Chemistry into health benefits*” celebrado en Gdansk (Polonia) en julio de 2011.

Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by ^1H -NMR

David Castejón · Inmaculada Mateos-Aparicio ·
M. Dolores Molero · M. Isabel Cambero ·
Antonio Herrera

Received: 12 June 2013 / Accepted: 21 October 2013 / Published online: 14 November 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract In recent years, new different methods for the determination of fatty acid types (FAT) by nuclear magnetic resonance (NMR) have been developed. Although in general good results have been obtained, these methods employ long acquisition times and a wide variety of approaches and NMR parameters to resolve the FAT. For this reason, we have developed a NMR analysis optimization. This new method was used to evaluate the different ^1H -NMR methodologies against gas chromatography–flame ionization detection (GC-FID), considered as the reference method. We have applied our easy and quick methodology to the analysis of three different composition oils: sunflower, olive, and linseed oil. Using our optimized NMR methodology, it was possible to obtain in <1 min the FAT with the same accuracy and better reproducibility than by GC-FID. Furthermore, a complete ^1H -NMR spectrum assignation and evaluation of minor

components allows obtaining extra information about the composition, quality, and conservation of the analyzed edible oils.

Keywords Edible oils · ^1H -NMR · Olive oil · Sunflower oil · Linseed oil · GC-FID

Introduction

Nowadays, people are conscious of relationship between rich fat diet and obesity, coronary heart disease, and cancer (Wanders et al. 2010). The research process and the consumer demands have produced a revolution in the modified fat products field. From a nutritional standpoint, lipids rich in cis-mono- and polyunsaturated fatty acids (FA; Table S1 in supplementary information shows all abbreviations used in the manuscript) are considered to confer positive health benefits while saturated and trans FA are considered to have negative health implications (Wanders et al. 2010). Due to these generalizations and the public's perceptions, the compositional makeup of a lipid, in terms of the percentages of saturates (SFA), cis-monounsaturates (MUFA), and polyunsaturates (PUFA) is commonly required information on nutrition labels. In this regard, the percentage of SFA will be mandatory in nutritional labeling edible oils and moreover PUFA and MUFA in those foods with a related fat nutritional declaration from December 2014 in the European Union, Regulation 1169/2011 (European Union 2011). These compositional data are generally obtained by gas chromatography–flame ionization detection (GC-FID).

Vegetable oils are a major source of dietary FA. These edible oils are constituted of triglyceride (TG) molecules. The major FA present in TG from edible vegetable oils are the unsaturated oleic, linoleic, and linolenic followed by the saturated ones, mainly myristic, palmitic, and stearic acids

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12161-013-9747-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Castejón · M. D. Molero · A. Herrera
Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética
Nuclear y de Espín Electrónico, Universidad Complutense de
Madrid, 28040 Madrid, Spain

I. Mateos-Aparicio
Departamento de Nutrición y Bromatología II. Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

M. I. Cambero (✉)
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de
Madrid, 28040 Madrid, Spain
e-mail: icambero@ucm.es

A. Herrera
Departamento de Química Orgánica. Facultad de Químicas,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

(Mataix-Verdú 2009) with the exception of some tropical oils like palm oil that contains a high level of SFA (Rohman and Man 2011). As the composition of FA of the TG in edible vegetable oils changes from plant to plant, each vegetable oil has a characteristic composition. For these reasons, the determination of FAT of edible vegetable oils is essential for evaluating their suitability for different uses in the diet and in the food industry, as well as for the quality and origin control of foods. This is the reason to look for new analytical methods that allow for all of this information to be obtained in a simple way that is faster, cheaper, and without sample alteration.

In the last years, the use of nuclear magnetic resonance (NMR) in edible oils analysis has increased (Barison et al. 2010; Šmejkalová and Piccolo 2010; Alonso-Salces et al. 2010a,b, 2011; Hatzakis et al. 2008, 2011; Gao et al. 2009; Goicoechea and Guillen 2010; Segal et al. 2010; Silvagni et al. 2010a; Uriarte and Guillén 2010; Lucas-Torres et al. 2011; Retief et al. 2009; Vlahov 2009; Dayrit et al. 2008). These articles use the additional information that the NMR offered through the study of the ^1H , ^{13}C and ^{31}P spectra. We will focus on ^1H -NMR to avoid the long acquisition times for the ^{13}C experiments and the derivatization reaction needed in the ^{31}P -NMR applications.

The majority of studies carried out by ^1H -NMR in vegetable oils are focused on olive oil (Šmejkalová and Piccolo 2010; Alonso-Salces et al. 2010b, 2011; Mannina et al. 2009; Vigli et al. 2003; Sacchi et al. 1996) although there are also some on sunflower oil (Goicoechea and Guillen 2010; Guillen and Uriarte 2009), corn oil (Guillen and Goicoechea 2009), and sesame oil (Segal et al. 2010; Guillén and Ruiz 2004). These methods allow monitoring different processes like oxidation of the edible oil during thermal-induced degradation (Goicoechea and Guillen 2010; Guillen and Uriarte 2009; Guillén and Ruiz 2004; Silvagni et al. 2010b), oxidation by ozonation (Segal et al. 2010), room temperature oxidation (Guillen and Goicoechea 2009), adulterations (Šmejkalová and Piccolo 2010; Alonso-Salces et al. 2010a,b; Mannina et al. 2009; Vigli et al. 2003), and quality studies in olive oil (Sacchi et al. 1996). Recently, different results about edible oils composition by ^1H -NMR have been published (Barison et al. 2010; Guillen and Uriarte 2009; Sedman et al. 2010). These articles explain the approaches and the equations that were used to obtain the FA percentage for different oils by the ^1H -NMR spectrum. Traditionally, the FAT in edible oils has been determined by GC-FID, which is the Official Method from the American Oil Chemists' Society (AOCS) for the determination of fatty acids' content (American Oil Chemist's Society 2009a, b, c). This method uses procedures that are laborious and time and chemical consuming because it involves TG hydrolysis followed by esterification, separation, identification, and quantification by GC. In addition, these chromatographic methods require standards of fatty acids.

However, NMR allows the acquisition of the whole sample spectrum, avoiding long preparation time and organic solvents cost. NMR does not promote changes on to the nature of the sample. An additional advantage of NMR is the possibility to obtain important information of the studied oil through the analysis of the minor components registered in the ^1H -NMR spectrum. In this regard, it can be obtained information from adulteration, freshness, or degree of oxidation from the signals corresponding to β -sitosterol, α -linolenic, squalene, water, monoglycerides (MG), diglycerides (DG), aldehydes, or hydroperoxides (Alonso-Salces et al. 2010b; Mannina et al. 2009; Mannina and Sobolev 2011; Mannina and Segre 2002).

Nowadays, the different described ^1H -NMR methodologies for the determination of FAT in vegetable oils are quite confusing and difficult to apply, especially for nonspectroscopists who are the major stakeholders in the application. Each author uses a different ^1H -NMR spectral signal notation. For example, the sn-2 signal of the TG moiety is named as 2, 9, H, β , or J, respectively, by several authors (Vigli et al. 2003; Guillén and Ruiz 2003; Guillen and Uriarte 2009; Barison et al. 2010; Sedman et al. 2010). Additionally, different procedures for sample preparation and different ^1H -NMR acquisition parameter sets have been described (see Table S2 in supplementary information). Every described calculation method is the result of the different approaches about the considered ^1H -NMR signals and its calculation importance. According to this, diverse mathematical equations have been obtained for the FAT determination. The diverse spectral assignments employed for the ^1H signals do not enable an easy comparison of the proposed equations. Moreover, each method integrates different signals according to the approximations and the oil used. In summary, these methodologies are not easy to be used and their generalization and optimization is a demanding goal. Taking into account these premises, the present work aims to (1) optimize the NMR analysis of edible oils to obtain the FAT in the shortest time without loss of precision; (2) evaluate and improve the methods used to obtain the FAT by ^1H -NMR in comparison with the official method (GC-FID); (3) study of the acquired ^1H -NMR spectrum, which leads to the FAT, as a fingerprint of the studied oil, since it contains important information about specific major and minor components; and (4) to make easier for nonexperts the use of the NMR in the study of vegetable oils.

Materials and Methods

Materials The oils used were olive oil (0.4° acidity; the label does not show the FAT), refined sunflower oil (0.2° acidity; 13 % SFA, 27 % MUFA, and 60 % PUFA) and linseed oil (9 % SFA, 19 % MUFA, and 72 % PUFA), which were purchased from a local supermarket. The oils were divided

into aliquots and kept at -20°C in a freezer until the analysis. Oil degradation at this temperature is not significant (Alonso-Salces et al. 2011). To consider the repeatability (intraobserver variability) of the methods used to determine the fatty acids composition, samples of each oil were analyzed six times during 3 months by GC-FID and NMR. Each analysis was performed by triplicate.

GC-FID Analysis According to the AOCS methods (American Oil Chemist's Society 2009a, b, c), edible oil samples were initially submitted to a transesterification procedure in order to convert the TG into fatty acid methyl esters (FAME). For this, 100 mg of oil was methylated with 5 mL of 0.5 M sodium methoxide in methanol, heated to 60°C for 30 min and vortex-mixing every 5 min. Upon cooling, 1 ml of sulfuric acid (5 % in anhydrous methanol) was added, heated to 60°C for 30 min, and vortex-mixed every 5 min. After this, the reaction mixture was cooled to room temperature, and 2 ml of petroleum ether was added, vortex-mixed for about 15 s, and then centrifuged at 3,000 rpm for 3 min at 4°C . The ether phase containing the FAME was transferred to chromatography vials. The FAME were analyzed by GC-FID using a Hewlett Packard HP-6890 (Avondale, PA, USA) and a capillary column HP-Innowax (30 m length, 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness). Helium, at 2.0 ml/min, was used as the carrier gas, and a split/split less injector was used with a split ratio of 100:1. The temperature program was as follows: injector and detector temperatures were 250°C ; the initial column temperature was 200°C , which was maintained for 2 min, followed by a programmed rise to 245°C at $3.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then maintained for 7 min. The injection volume was 1.0 μl . Pentadecanoic acid (C15:0) was used as an internal standard. FAMES were identified by comparison with previously run standards.

NMR Analysis Oil sample (200 μl) was introduced directly into the 5-mm NMR tube with 400 μl of chloroform-d [99.8 at.% D, containing 0.1 % (v/v), tetramethylsilane (TMS)] and 10 μl of DMSO-d₆. This mixture of solvents ensures a perfect solubility of all minor oil components, even of those not soluble in pure chloroform (Sacchi et al. 1996). The sample was shaken with a vortex during 1 min.

The determinations of FAT were performed on a Bruker Avance 500 MHz. The NMR spectra were recorded at 25°C using a 5-mm multinuclear direct detection probe. The ^1H -NMR chemical shifts was referenced to zero using the internal reference signal (TMS). Bruker BioSpin supplied the pulse sequences and TopSpin 2.1 was the software package used for NMR data processing. Before the ^1H -NMR spectrum was acquired, for each sample, the probe was automatically locked, tuned, and matched. The field homogeneity has to be optimized, and a carefully shimming should be done. The quality of the shimming was evaluated for each sample using

the signal at 4.33 ppm due to the $\alpha\text{-CH}_2$ of the glycerol moiety (Mannina et al. 2009). All spectra were acquired without spinning.

To optimize the resonance parameters, it was considered as initial values those proposed in earlier reports (Guillen and Uriarte 2009). Initial parameters were as follows: number of scans (NS=64), time domain (TD=56 K), spectral width (SW=12.5 ppm), relaxation delay (d1=3 s), acquisition time (AQ=3.744 s), and pulse angle ($\alpha=90^{\circ}$) with a total experimental time of 12 min 54 s. This time was reduced at <1 min for our final analysis as it will be commented in "Acquisition parameters" in "Results and Discussion."

The ^1H -NMR spectrum was manually phased by applying zero- and first-order phase corrections, taking care to achieve good symmetry on all peaks. To obtain a quantitative comparison of the spectra, the baseline was corrected using a polynomial function. The integral data extracted from the spectrum was analyzed using standard software (Microsoft Office Excel 2007).

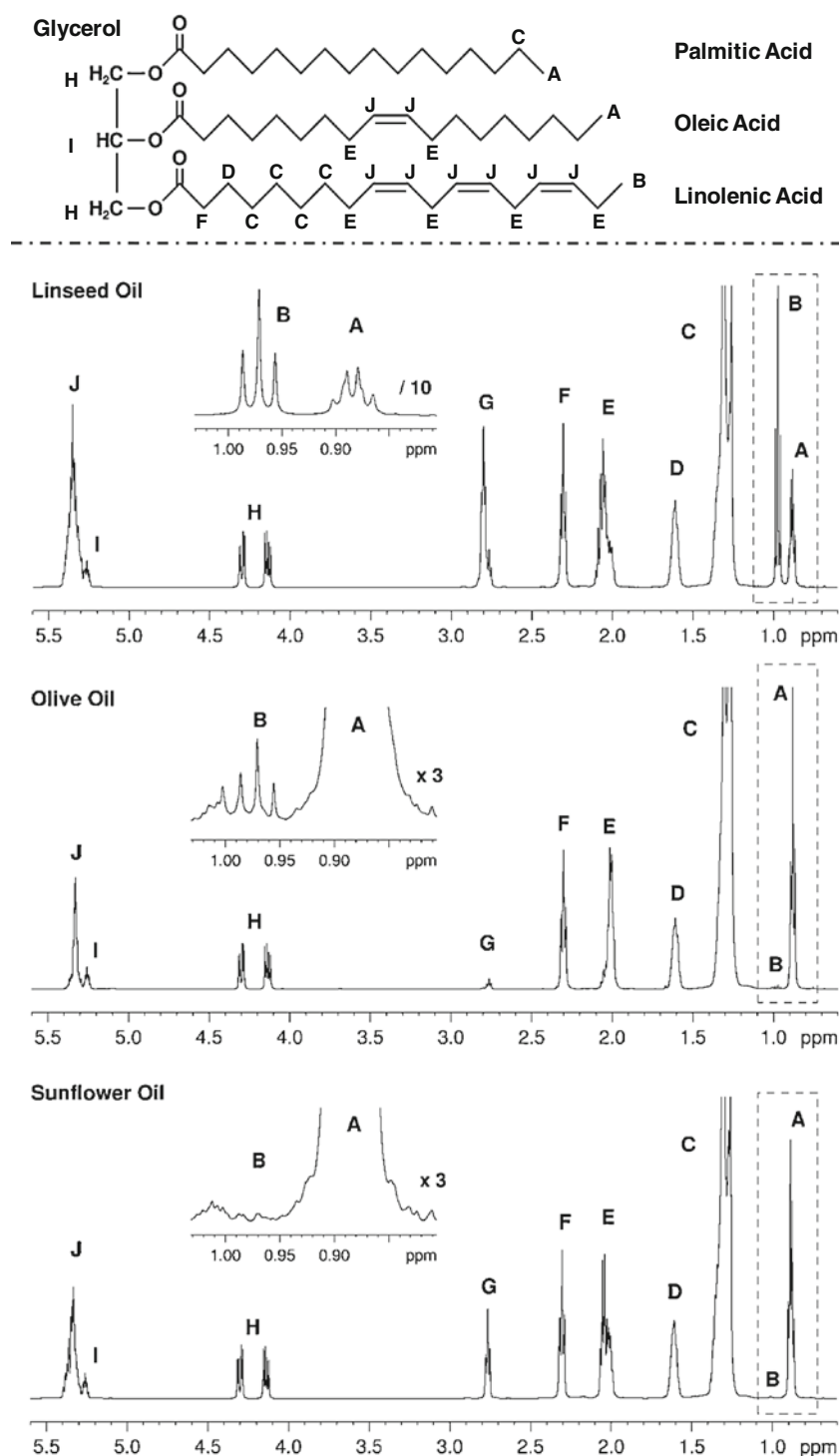
Statistical Analysis The results were compared by analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range tests to determine statistically significant differences ($p \leq 0.05$). These analyses have been made using Statgraphic 5.1 (Warrenton, VA, USA). The values are expressed as means \pm standard deviation.

Results and Discussion

Optimization of the NMR Analysis In the present work, we have adopted an easier systematic nomenclature based on the increasing chemical shifts of the signals belonging the whole components possible present in the edible oil samples. Figure 1 shows the nomenclature applied for TG backbone and FA together with the ^1H -NMR spectra from linseed, olive, and sunflower oil as well as the assignment of signals. Palmitic, oleic, and linolenic acids are good representative examples of the structures studied since it produces all signals observed (A–J). This nomenclature will be used along the manuscript.

Acquisition Parameters As first step, we have carried out an optimization of the already described NMR parameters. Our aim here was to reduce as much as possible the time required to obtain spectra with enough quality and standardize the different experimental conditions used in previous analysis mentioned in "Introduction." As a basic criterion for the intensity of ^1H -NMR spectra, the smallest peak to be integrated should present a signal to noise ratio (S/N) of at least 250:1 (Holzgrabe 2010). Additionally, the spectral resolution was adjusted to be at least the half of the line width at half-height.

Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of olive, linseed, and sunflower oils with respective assignment of the signals of the glycerol unit and the fatty acid chains. Spectra contain the expansion of the region (1.03–0.81 ppm). The figure also shows *top* the structure and nomenclature used for the glycerol and fatty acids protons



The recycle time should be at least five times the highest relaxation delay value (T1) of the integrated signals. According to these premises the principal NMR parameters were optimized: number of scans (NS), time domain (TD), spectral width (SW), relaxation delay (d1), and pulse angle (α). Each determination was repeated three times.

The proton T1 relaxation time was determined using the standard inversion recovery T1 pulse sequence provided in the

Bruker NMR software TOPSPIN. Table 1 shows the obtained T1 values. The highest value of T1 was 2.42 s and belongs to the protons of the methyl group (signal A). Based on this value, it was fixed a total time (TT) of 12.5 s [$\text{TT} = \text{d1} + \text{acquisition time (AQ)} \geq 5 \times \text{T1}$]. A TD of 64 k ($\text{AQ} \sim 4$ s) and a starting value of 8.5 s for d1 were introduced. An optimization of the d1 value from 8.5 to 2.5 s was performed, reducing 1 s in each new experiment. The FAT was calculated for each

Table 1 Chemical shift assignment of ^1H -NMR signals (A–J) for the main components in vegetable oils with the peak notation shown in Fig. 1

δ (ppm)	Assignment	Proton	Peak notation	T1 (s)	Integral limits (ppm)
0.88	Fatty acids (FA)	CH_3	A	2.42–2.40	0.930–0.827
0.97	Fatty acids (omega-3)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	B	2.26–1.98	1.010–0.930
1.29	Fatty acids (FA)	$(\text{CH}_2)_n$	C	—	—
1.61	Fatty acids (FA)	$\text{CH}_2-\text{CH}_2'-\text{CH}_2-000\text{R}$	D	—	—
2.01	Unsaturated fatty acids	$(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n$	E	1.06–1.04	2.120–1.932
2.27	Fatty acids (FA)	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$	F	0.85–0.84	2.357–2.248
2.76	Polyunsaturated fatty acids	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$	G	1.60–1.41	2.889–2.675
4.12	Triglycerides (TG)	$\text{CH}_2-\alpha$	H	0.56–0.53	4.373–4.070
4.31	Triglycerides (TG)	$\text{CH}_2-\alpha'$	H	0.56–0.53	4.373–4.070
5.25	Triglycerides (TG)	$\text{CH}-\beta$	I	—	—
5.35	Unsaturated fatty acids	$\text{CH}:\text{CH}$	J	—	—

The table includes also the values of the calculated relaxation times (T1) and the integral regions selected for the FAC calculation

experiment in order to evaluate how the reduction of the d1 value affects to the result. The same FAT values were obtained for d1 between 8.5 and 4.5 s. Therefore, a value of d1=4.5 s was taken for experiments. This leads to a final TT value of 8.5 s.

The NS was varied from 64 to 1 scans (64, 32, 16, 8, 4, 2, and 1). In all cases studied, even for a NS equal to one, the S/N ratio was higher than 250 for the less intense signal necessary to be integrated. A NS of 4 was selected to ensure sufficient signal intensity.

FA and TG show ^1H resonances from their aliphatic protons in the range 0.88 to 4.35 ppm (Guillen and Uriarte 2009). Taking into account that one of our aims is to obtain additional information about minor components present in the oil samples, we have extended the SW until 11.5 ppm. That is the region where the OH of the carboxyl group from free FA (FFA) appears (Barison et al. 2010). We have additionally enhanced the SW 10 % at each side. The final value of the spectral width was 14.5 ppm (7,250 Hz at 500 MHz spectrometer).

In order to evaluate the minimum value of TD necessary for the experiment, we have taken the TMS signal and calculated the width at half height. As the lowest resolution, a value of 0.75 Hz for the signal width was fixed. For the final TD calculation, the TT must be fixed as a constant. When the TD value decreases, it leads to a reduction of the AQ, which we have compensated with an increase in the d1 value. Our results show that a TD value of 16 k (AQ=1.13 s) is enough to ensure a minimum resolution without lost of precision in the results. It should be taken into account that the AQ must be sufficiently long to allow the free induction decay (FID) decay and to avoid truncation artifacts. We have selected a TD of 64 k that involves an AQ of 4.52 s. This election ensures that the FID has decayed completely and not noise has been included. Using the mentioned values of d1, AQ, and T1, the angle pulse was calculated using the Ernst's equation ($\cos\theta = e^{-[(d1+AQ)/T1]}$). An excitation

angle of 88.30° was obtained. This value is very close to the standard 90° pulse. Due to this, the pulse applied was 90° . A number of dummy scans (DS) equal to 2 were selected (typically used to ensure that a spin system is in a steady state before data are collected). According to this, the selected conditions were as follows: SW=14.5 ppm, TD=64 k, AQ=4.52 s, d1=4 s, TT=8.5 s, NS=4, DS=2, and $\alpha=90^\circ$. The total experimental time was 56 s. That means that taking this optimized parameter set, the spectral information required can be achieved from the ^1H -NMR spectrum in <1 min without decreasing the accuracy of the analysis. This have permitted to reduce substantially the experimental time described by Guillen and Uriarte (2009) (~13 min) and by Sedman et al. (2010) (~30 min).

Processing A factor that must be taken into account in the processing is the determining of the integration limits for those signals taken for the calculation of the FAT (signals A, B, E, F, G, and H in Fig. 1). These values must be carefully selected to avoid the inclusion of side bands that would affect the precision of the result. Despite the fact that the limits of integration are a determining factor, only Sedman et al. (2010) have mentioned this important aspect in their article.

A correct determination of the integration limits is also one of the main reasons why these different three oils have been selected. Due to their composition, they represent three extreme cases that we could find in the study of edible oils by NMR. Results from them should make possible the proper selection of the integration limits that can be taken for the analysis of oils regardless of its composition. For the selection of the integration limits, the following aspects were taken into account: (1) signal width. It is especially important in case of large intensity differences between signals [i.e. methyl from omega 3 (signal B), minor in olive oil, and major in linseed oil] and (2) ^{13}C satellites of methyl group from fatty acid chains (with exception of linolenic acid), which overlaps, at

magnetic fields of 500 MHz or higher, with the triplet of the methyl group from linolenic acid. This fact makes difficult a correct integral measurement (Mannina and Sobolev 2011). To evaluate the influence of the region that must be integrated, three different integration limits were selected including/excluding and without dependence of the ^{13}C satellite signals. These three different integration limits were tested and the results compared with those obtained from GC-FID. The closest results between GC-FID and NMR were obtained with the limits: 0.930–0.827 ppm (signal A), 1.010–0.930 ppm (signal B), 2.120–1.932 ppm (signal E), 2.357–2.248 ppm (signal F), 2.889–2.675 ppm (signal G), and 4.373–4.070 ppm (signal H). These last integration limits corresponds to the option where the regions were selected independently of the presence of ^{13}C satellite signals. The sum of the integral values was normalized to 100.

It should be mentioned that the integration of methylene ^1H resonances from *sn*-1,3 of the TG moiety (4.14 and 4.30 ppm, signals H) include the overlapping with their ^{13}C satellite signals and with the signals of the 1,3-DG (see arrows and asterisks in Fig. 2a). This systematic integration error cannot be avoided, and therefore, it must be taken into account in the evaluation of the FAT results, especially in studies with aged oils which present a high amount of 1,3-DG.

Analysis of the Minor Components The simple ^1H -NMR spectrum obtained with our methodology is also able to be used in the analysis of minor components present in the oil samples. This represents an additional advantage in comparison with the standard method GC-FID. Table 2 shows the minor and mayor signals assigned in the analyzed oils and in previous works (Barison et al. 2010; Alonso-Salces et al. 2010a, 2011; Hatzakis et al. 2011; Goicoechea and Guillen 2010; Mannina et al. 2001, 2009; Sacchi et al. 1996; Guillen and Uriarte 2009; Sedman et al. 2010; Mannina and Sobolev 2011; Dais and Hatnakis 2013). Table 2 also shows the direct information that can be extracted from some of these signals (adulteration, quality, or freshness). This table tries to be a guide that explains all the NMR spectral assignation of vegetable oils. During the study NMR bidimensional experiments homonuclear (^1H – ^1H correlation) and heteronuclear (^1H – ^{13}C correlation) were acquired to confirm some assignments. For a comprehensive explanation of the different signals, Table 2 shows also values of the coupling constants ($^1J_{\text{CH}}$) and the positions of the ^{13}C satellites signals, which are dependent on the magnetic field used.

FAT Obtained by NMR vs. GC-FID Figure 1 shows the obtained ^1H -NMR spectra from linseed, olive, and sunflower oil. The spectra starts at downfield with the signal A (0.88 ppm), which corresponds to CH_3 for all FA (excluding omega-3 FA) and finish with signals of the double bonds (5.40 ppm), which is denoted by the letter J. ^1H NMR spectra from edible oils

show the same signals excepting those oils which contains omega-3 FA. The signal B (triplet at 0.98 ppm) belongs to the terminal CH_3 group from omega-3 FA. Due to this, signal B is present in linseed and olive oil spectra (Fig. 1). In vegetable oils, this signal is produced by the methyl groups from α -linolenic acid. Table 1 contains information regarding chemical shift, type of compound, H-assignation, peak notation, T1, and integration limits from the signals found in the ^1H -NMR spectra.

Starting from the already described mathematical expressions used in the literature (Vigli et al. 2003; Guillen and Uriarte 2009; Guillén and Ruiz 2004) and from the methodology suggested by Barison et al. (2010), we propose here six different systems of equations to obtain the FAT directly from the ^1H -NMR spectra that were denoted with CM-NMR-1 to CM-NMR-6 (Table 3). These equations use different approximations (1–3) to calculate the total FA (TFA) values. CM-NMR-1, CM-NMR-2, and CM-NMR-5 consider that each acyl chain contains two methylenic protons in α -position to the carboxyl group (approximation 1). These equations contemplate exclusively the FA chain to obtain the proportional intensity between proton signals. CM-NMR-3, CM-NMR-4, and CM-NMR-6 assume that all FA are esterified to a common moiety forming TG (approximation 2). To obtain the relationship between signals, these equations take into account the whole structure of TG (glycerol moiety and FA attached). CM-NMR-4 is a new system of equations developed in base to previous studies (Barison et al. 2011). It uses exclusively one of the signals H (doublet of doublets centered at 4.30 ppm) to calculate the TFA (approximation 2B). It represents an alternative to approximation 2, which can be assumed since MG and DG levels are low in vegetable oils (Vigli et al. 2003; Miyake et al. 1998). Equations CM-NMR-1, CM-NMR-2, and CM-NMR-3 consider the TFA content as a sum of the methyl signals A and B to calculate the amount of linolenic FA (approximation 3). Table 3 summarizes the approximations used for each equation.

We have proposed a single way the validity of the approximation 2 by studying the relationship between signals F and H. This ratio should give a constant value close to 1.5 in TG, since the signal F (CH_2 in α to the carboxylic acid) represents six protons and the signal H (CH_2 from *sn*-1,3 TG) four (see Fig. 1). The obtained F/H ratio in the studied oils was 1.51 for olive oil, 1.53 for sunflower oil, and 1.50 for linseed oil. A different value from 1.50 can be associated to a higher concentration of DG, MG, and/or FFA. As shown in Table 3, the TFA content in equation CM-NMR-5 is given by the integration of the signal F, whereas in CM-NMR-6 is by signal H. Taking into account that the relationship between the signals F and H is constant, the results obtained by CM-NMR-5 and CM-NMR-6 must be close to each other.

Another important component in the estimation of FAT is the presence or absence of trans-FA. Trans-FA shows a

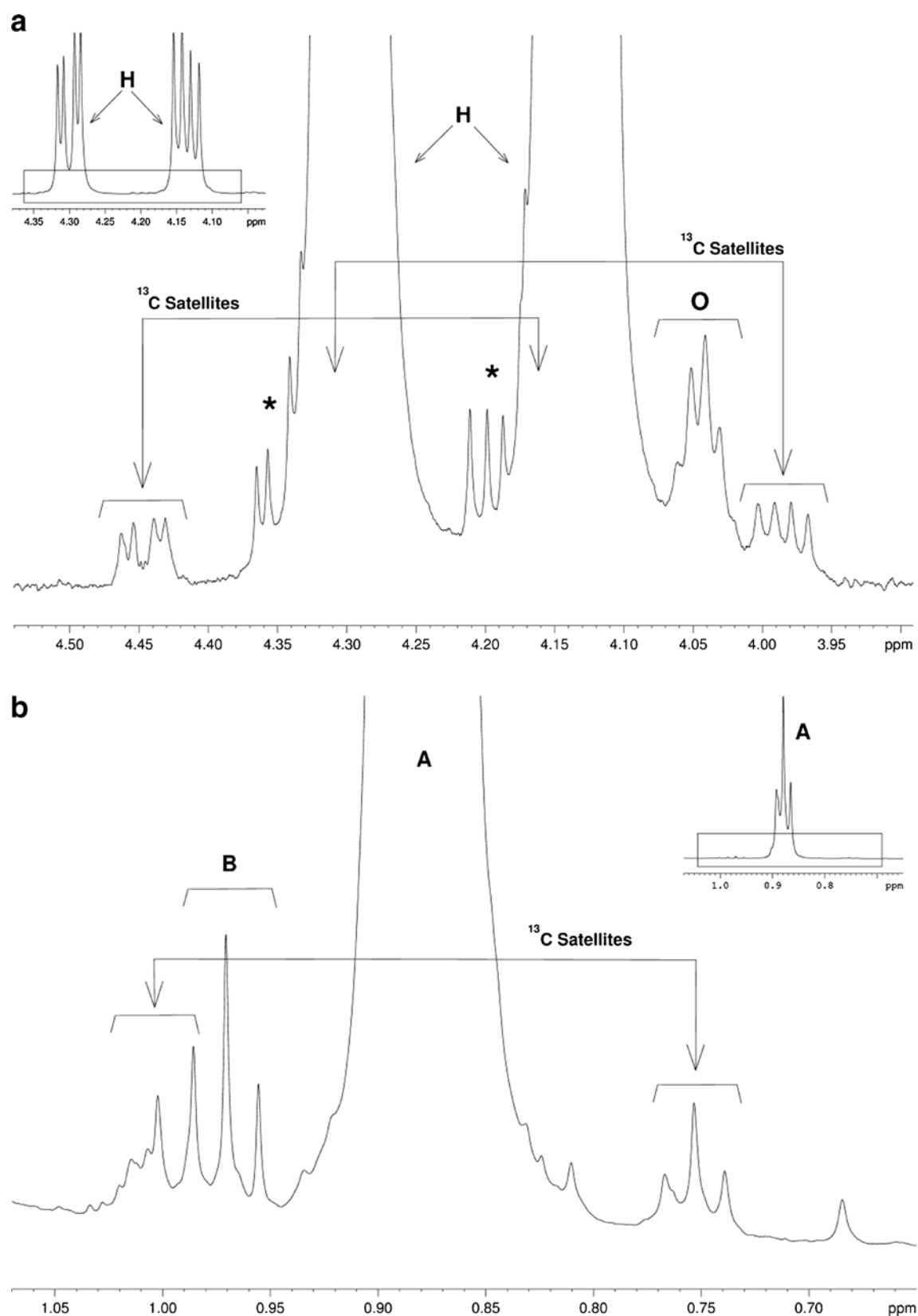


Fig. 2 Expanded areas of ^1H spectrum of olive oil. **a** Top Spectral region of the α,α' -TG. The expansion of the base of the signal H shows its ^{13}C satellites (arrows) and the signals from the *sn*-1,2 DG (circle) and *sn*-1,3

DG (asterisk). **b** Bottom shows the spectral region of the methyl FA (signals A and B). The expansion of the base of the signal A shows its ^{13}C satellites (arrows) and signal B (low intensity in olive oil)

Table 2 Signal assignments for ^1H -NMR spectrum

δ (ppm)	Assignment	Proton (M^a/J_b)	Additional information
-0.42	Chorophyll	NH	Broad signal associated with adulteration (Mannina and Sobolev 2011)
0.32	Cycloartenol	CH_2 (d)	Cycloropanic ring (Alonso-Salces et al. 2011)
0.54	Cyclopropene	CH_2 (s)	Natural cyclic fatty acids
0.56	Cycloartenol	CH_2 (d)	Cycloropanic ring (Alonso-Salces et al. 2011)
0.68	β -Sitosterol	CH_3 (s)	Adulteration (Mannina et al. 2009)
0.69	Stigmasterol	CH_3 (s)	Stigmasterol (Alonso-Salces et al. 2011)
0.75	^{13}C satellite (A)	($t^1J_{\text{CH}}=125.43$ Hz)	Oleyl chains (Sacchi et al. 1996)
0.76	^{13}C satellite (A)	($t^1J_{\text{CH}}=125.43$ Hz)	Polyunsaturated chains (Sacchi et al. 1996)
0.81	Not identified (NI)	NI (s)	—
0.88	Fatty acid (A)	CH_3 (t)	Oleyl and saturated chains
0.89	Fatty acid (A)	CH_3 (t)	Linoleic chain
0.97	Fatty acid- $\omega 3$ (B)	CH_3 (t)	Adulteracion (Sacchi et al. 1996)
1.00	^{13}C satellite (A)	($u^1J_{\text{CH}}=125.43$ Hz)	Oleyl chains (Sacchi et al. 1996)
1.01	^{13}C satellite (B)	($u^1J_{\text{CH}}=124.06$ Hz)	Polyunsaturated chains (Sacchi et al. 1996)
1.17	^{13}C satellite (C)	(m)	Saturated FA (Guillen and Uriarte 2009)
1.26	Fatty acid (C)	(CH_2) _n (s)	Saturated FA (Guillen and Uriarte 2009)
1.27	Fatty acid (C)	(CH_2) _n (s)	Oleyl chains (Guillen and Uriarte 2009)
1.30	Fatty acid (C)	(CH_2) _n (s)	Unsaturated FA chains (Guillen and Uriarte 2009)
1.58	H_2O	OH (s)	Storage degradation, off-flavors (Sacchi et al. 1996)
1.61	Fatty acid (D)	$\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (m)	All acyl chains
1.67	Squalene	CH_3 (s)	The lack means adulteration (Mannina et al. 2009)
1.74	^{13}C satellite (D)	($u^1J_{\text{CH}}=128.62$ Hz)	All acyl chains
1.88	^{13}C satellite (E)	(m)	Oleyl chains
1.92	^{13}C satellite (E)	(m)	Linoleic chains—all acyl chains
1.93	^{13}C satellite (E)	(m)	Linolenic chains
1.96	Fatty acid	$\text{CH}_2(\text{trans})-\text{CH}=\text{CH}$ (u)	Trans FA (Sedman et al. 2010)
2.01	Fatty acid (E)	$\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ (qu)	Oleic chains
2.05	Fatty acid (E)	$\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ (qu)	Linoleic chains
2.07	Fatty acid (E)	$\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ (m)	Linolenic chains
2.13	^{13}C satellite (E)	(m)	Oleyl chains
2.17	^{13}C satellite (E-F)	(m)	Linoleic chains—all acyl chains
2.20	^{13}C satellite (E)	(m)	Linolenic chains
2.30	Fatty acid (F)	$\text{OCO}-\text{CH}_2-$ (m)	All acyl chains
2.43	^{13}C satellite (F)	($u^1J_{\text{CH}}=128.43$ Hz)	All acyl chains
2.56	DMSO	CH_3 (m)	Solvent
2.64	^{13}C satellite (G)	($t^1J_{\text{CH}}=125.98$ Hz)	Linoleic chains
2.67	^{13}C satellite (G)	($t^1J_{\text{CH}}=125.98$ Hz)	Linolenic chains
2.76	Fatty acid (G)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ (t)	Linoleic acid—adulteration (Mannina et al. 2009)
2.80	Fatty acid (G)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ (t)	Linolenic acid—adulteration (Mannina et al. 2009)
2.88	^{13}C satellite (G)	($t^1J_{\text{CH}}=125.98$ Hz)	Linoleic chains
2.92	^{13}C satellite (G)	($t^1J_{\text{CH}}=125.98$ Hz)	Linolenic chains
3.62	sn-1 in monoglyceride	CH_2 (m)	sn-1 monoglyceride (Hatzakis et al. 2011)
3.69	sn-1,2 in diglyceride	CH_2 (d)	Free acidity—good quality and freshness sn-1,2/sn-1,3 (Sacchi et al. 1996)
3.73	Saturated alcohols	CH	Saturated alcohols present as minor components (Sacchi et al. 1996)
3.98	Acetic acid	CH	Vinegary odor (Mannina and Sobolev 2011)
3.99	^{13}C satellite (H)	($dd^1J_{\text{CH}}=148.60$ Hz)	Triglyceride

Table 2 (continued)

δ (ppm)	Assignment	Proton (M^a/J_b)	Additional information
4.05	sn-1,3 diglyceride	CH_2 (m)	Free acidity/good quality and freshness sn1,2/sn1,3 (Sacchi et al. 1996)
4.14	Triglycerides (H)	CH_2OCOR (dd)	All FA- CH_2 of triglyceride
4.19	sn-1,2 diglyceride	CH_2 (dd)	All FA- CH_2 of sn-1,2 diglyceride
4.30	Triglycerides (H)	CH_2OCOR (dd)	All FA- CH_2 of triglyceride
4.35	sn-1,2 diglyceride	CH_2 (dd)	All FA- CH_2 of sn-1,2 diglyceride
4.45	^{13}C satellite (H)	(dd/ $^1J_{CH}=148.60$ Hz)	Triglyceride
4.58	Terpene	CH (d)	Unknown terpene (Alonso-Salces et al. 2011)
4.66	Terpene	CH (s)	Unknown terpene (Alonso-Salces et al. 2011)
4.71	Terpene	CH (s)	Unknown terpene (Alonso-Salces et al. 2011)
4.88	Cycloartenol	—	Cycloartenol (Dais and Hatnakis 2013)
5.10	sn-1,2 diglyceride	CHOCOR (m)	Between 5,05–5,15
5.26	Triglycerides (I)	CHOCOR (m)	β -CH of glycerol backbone
5.33	Fatty acid (J)	CH=CH (m)	Oleyl chains—total degree of unsaturation
5.35	Fatty acid (J)	CH=CH (m)	Polyunsaturated chains—total degree of unsaturation
5.40	Hydroperoxides	CH=CH-CH=CH (m)	Natural or by-product of oxidation (Guillen and Uriarte 2009)
5.48	Hydroperoxides	CH=CH-CH=CH (m)	Natural or by-product of oxidation (Guillen and Uriarte 2009)
5.63	Hydroperoxides	CH=CH-CH=CH (m)	Natural or by-product of oxidation (Guillen and Uriarte 2009)
5.66	Hydroperoxides	CH=CH-CH=CH (m)	Natural or by-product of oxidation (Guillen and Uriarte 2009)
5.96	Hydroperoxides	CH=CH-CH=CH (t)	Natural or by-product of oxidation (Guillen and Uriarte 2009)
6.48	Hydroperoxides	CH=CH-CH=CH (m)	Natural or by-product of oxidation (Guillen and Uriarte 2009)
6.75	Phenolic compounds	CH	Antioxidants and radical scavengers (Sacchi et al. 1996)
8.00	Formaldehyde	CH_2O	Pungent taste (Mannina et al. 2001)
8.07	Hydroperoxides	OOH (s)	Hydroperoxide group (Goicoechea and Guillen 2010)
9.46	(E)-2-Hexenal	COH (d)	Positive sensory impact—green-fruity odor (Sacchi et al. 1996; Mannina and Sobolev 2011)
9.49	(E)-2-alkanals	COH (d)	Secondary degradation by-products (Guillen and Uriarte 2009)
9.52	(E,E)-2,4-alkadienals	COH (d)	Secondary degradation by-products (Guillen and Uriarte 2009)
9.74	Hexanal	COH (m)	Saturated aldehydes (hexanal–heptanal) (Sacchi et al. 1996)
9.75	n-Alkanals	COH (t)	Secondary degradation by-products (Guillen and Uriarte 2009)
9.57	4-Hydroxy-(E)-2-alkadienals	COH (d)	Secondary degradation by-products (Guillen and Uriarte 2009)
9.59	(Z,E)-2,4-alkadienals	COH (d)	Secondary degradation by-products (Guillen and Uriarte 2009)
9.78	4-Oxoalkanals	COH (t)	Secondary degradation by-products (Guillen and Uriarte 2009)
11.50	Free fatty acid	COOH	Broad singlet—176 ppm (^{13}C spectrum) (Barison et al. 2010)

The table shows the principal and secondary components in edible oils and related information

^aSignal multiplicity: δ chemical shift, *s* singlet, *d* doublet, *t* triplet, *qu* quartet, *u* unresolved

^bCoupling constants $^1J_{CH}$

characteristic signal at 1.96 ppm in the 1H -NMR spectrum (Sedman et al. 2010). Its inclusion to the FAT has been evaluated in the analyzed oils. Results have shown that its consideration can lead to an error because sometimes negative integrated values were obtained. This fact is due to the low concentration of trans-FA present in vegetable oils. Due to this, this signal has not been taken into account for the calculations of FAT. However, it should be mentioned that the calculation of trans-FA percentage by 1H -NMR spectrum remains interesting mainly in studies of food with higher trans-FA concentration.

Once integrated the signals and entered the values in the equations shown in Table 3, the values of SFA, MUFA, and PUFA were obtained. To evaluate the data acquired by the different equations, the values of SFA, MUFA, and PUFA should be normalize. In previous studies (Barison et al. 2010), it was considered that if the sum of the FA (SFA+MUFA+PUFA) obtained exceeds the 100 %, this additional amount can be assigned to the percentage of the free FA presents in the oil. The best way to evaluate this claim by NMR is performing a ^{13}C -NMR spectrum. Quaternary

Table 3 Different equations and approximations used to evaluate FAT calculation in edible oils by $^1\text{H-NMR}$

	Linolenic acid	Linoleic acid	Oleic acid	SFA	MUFA	PUFA	Approximation
CM-NMR-1	$B/(A+B)$	$(3 \times G - 4 \times B)/(3 \times F)$	$(E/2 \times F) - [\text{linoleic}] - [\text{linolenic}]$	$(A/(A+B)) - [\text{linoleic}] - [\text{linolenic}] - (E/(2 \times F))$	[oleic]	$[\text{linoleic}] + [\text{linolenic}]$	1 and 3
CM-NMR-2	$B/(A+B)$	$[(G/F) - 2 \times (B/(A+B))]$	$(E/2 \times F) - (G/F) + (B/(A+B))$	$1 - (E/(2 \times F))$	[oleic]	$[\text{linoleic}] + [\text{linolenic}]$	1 and 3
CM-NMR-3	$B/(A+B)$	$(2 \times G/3 \times H) - (2 \times (B/(A+B)))$	$((E - 2 \times G/3 \times H) + (B/(A+B)))$	$1 - (E/(3 \times H))$	[oleic]	$[\text{linoleic}] + [\text{linolenic}]$	2 and 3
CM-NMR-4	$(2 \times B)/(9 \times (H/2))$	$(G/3 \times (H/2)) - ((2 \times B)/9 \times (H/2))$	$(E/6 \times (H/2)) - [\text{linoleic}] - [\text{linolenic}]$	$(F/3 \times (H/2)) - [\text{oleic}] - [\text{linoleic}] - [\text{linolenic}]$	[oleic]	$[\text{linoleic}] + [\text{linolenic}]$	2b
CM-NMR-5	–	–	–	$(4 \times A + 4 \times B - 3 \times E)/6 \times F$	$(4 \times B + 3 \times E - 6 \times G)/6 \times F$	$(3 \times G - 2 \times B)/3 \times F$	1
CM-NMR-6	–	–	–	$(4 \times A + 4 \times B - 3 \times E)/9 \times H$	$(4 \times B + 3 \times E - 6 \times G)/9 \times H$	$(6 \times G - 4 \times B)/9 \times H$	2

Letters A–J correspond to the signals obtained in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum

carbonyl carbons of the FFA give a characteristic signal at 176 ppm (Hidalgo and Zamora 2003). An integrated ^{13}C experiment was acquired for the three different oils whereby the signal of the FFA is absent (see Figure S1). Therefore, we decided to take the total amount of FA obtained by each methodology and generalize back to a final value of 100%.

Table 4 shows the mean values and standard deviations of FAT obtained by the different CM-NMR equations (1–5,6) in comparison with GC-FID for the three analyzed oils. The lowercase letters express the result of the variance analysis. The data show that, in general, the precision and repeatability obtained by the different CM-NMR equations are similar and, in many cases, better than those obtained by GC-FID. In olive oil, the methodology based in the CM-NMR equations has shown a standard deviation less than the obtained by GC-FID. Best results were obtained with CM-NMR-3 in all cases, independently of the type of oil and the FA studied.

The FAT for linseed oil obtained by the CM-NMR-1 equation is not listed in the Table 4. Equation CM-NMR-1 is based in previous studies (Vigli et al. 2003) and shows a systematic error underestimating the value of the SFA. The reason consists in a double subtraction of the linolenic FA value in the SFA calculation in equation CM-NMR-1. This error is not noticeable in olive and sunflower oils, which contain a low concentration of linolenic acid. In contrast, FAT results made no sense in linseed oil, which contains an appreciable amount of linolenic acid. Comparing the FAT values obtained by CM-NMR equations against those obtained by the official method, GC-FID, in olive and linseed oil (Table 4), the closest values were obtained by CM-NMR-5–6. As expected, the data obtained by CM-NMR-5 and CM-NMR-6 were equal, and for this reason, they were included in Table 4 as CM-NMR-5,6. In linseed oil, the FAT obtained by this approach does not present significant differences with the data from GC-FID. In olive oil, the results show significant differences ($p < 0.05$) for PUFA. Additionally, as shown in Table 4, all CM-NMR-equations methods have a tendency to underestimate the PUFA. That is probably due to errors in the integration of signal B from linolenic acid, which is present in small quantities in olive oil (Fig. 1).

In sunflower oil, best results were obtained with the equation CM-NMR-3, which obtains a result for SFA, MUFA, and PUFA that did not show significant differences with the data collected by GC-FID. CM-NMR-1 does not present significant differences in SFA and PUFA and does not present the error mentioned previously because sunflower oil does not contain alpha-linolenic acid. This approach presents an error associated with the integration of the signal F, which has presented the highest standard deviation value in all studied oils. On the other hand, the approach considers that all the FAs are esterified to the TG moiety. This hypothesis leads to big errors in oils, which, due to its nature or stability during storage, present high percentage of DG and MG.

Table 4 Mean values and standard deviations of FAT of edible oils obtained by the different NMR methods and by the official one (GC-FID)

		NMR methods						GC-FID
		CM-NMR-1	CM-NMR-2	CM-NMR-3	CM-NMR-4	CM-NMR-5	CM-NMR-6	
Olive	SFA	12.5±0.5 b	14.5±0.4 a	14.4±0.1 a	14.5±0.4 a	14.6±0.2 a	14.6±0.2 a	14.1±1.0 a
	MUFA	80.9±0.6 a	79.0±0.5 b	79.1±0.2 b	79.0±0.5 b	78.9±0.2 bc	78.9±0.2 bc	78.4±0.8 c
	PUFA	6.6±0.2 b	6.5±0.1 b	6.5±0.2 b	6.5±0.1 b	6.5±0.2 b	6.5±0.2 b	7.5±0.2 a
Sunflower	SFA	12.2±0.7 e	13.8±0.7 ab	13.0±0.1 cd	13.8±0.7 ab	13.9±0.2 a	13.9±0.2 a	12.7±0.1 cde
	MUFA	34.8±0.3 c	34.2±0.2 e	34.5±0.1 d	34.2±0.3 e	34.1±0.1 e	34.1±0.1 e	34.5±0.2 d
	PUFA	53.0±0.4 a	52.0±0.5 b	52.6±0.1 a	52.0±0.5 b	52.0±0.2 b	52.0±0.2 b	52.8±0.3 a
Linseed	SFA	–	9.1±0.5 c	9.3±0.1 bc	9.1±0.5 c	10.1±0.3 a	10.1±0.3 a	9.7±0.2 ab
	MUFA	–	18.6±0.1 c	18.6±0.2 bc	19.1±0.2 ab	18.9±0.1 ab	18.9±0.1 ab	19.4±0.5 a
	PUFA	–	72.4±0.6 a	72.0±0.1 ab	71.8±0.5 b	71.0±0.3 c	71.0±0.3 c	70.6±0.6 c

Different letters in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$)

In addition, it is important to mention that the integration of signal B could be a problem because this signal is generally small in most of the vegetable oils and includes an error (Vigli et al. 2003). Figure 2b shows signal B and the overlapping problem with the ^{13}C satellites signal from signal A. Due to this, we have tried to exclude the signal B for the FAT calculation. This was not possible for oils that contain omega-3 FA. On the contrary, the inclusion of signal B in those oils that do not contain linolenic FA could introduce an error in the calculation of FAT. In order to evaluate this possible error, we have compared the values obtained with and without consideration of signal B in sunflower oil. The results using this approach did not show significant different with those achieved without this approximation (see Table S3).

The standardization of the described methodologies has permitted the evaluation and comparison among the different approaches and alternatives for FAT analysis by NMR. Determination of the composition from the three selected oils represents three extreme cases to find in studies with vegetable edible oils. The results show that the equations CM-NMR-5 and CM-NMR-6 did not show significant differences for linseed oil. In case of olive oil, these equations gave a small deviation of around 1 % in the calculation of PUFA in comparison with those obtained by GC-FID. Although the best choice for sunflower oil was CM-NMR-3, CM-NMR-5,6 offers also a good alternative to the data collected by chromatography. One might therefore conclude that this method would be the most suitable for the study of vegetable oils by NMR regardless of its composition.

In this work, the proposed conditions to perform the ^1H -NMR experiments have permitted to obtain the FAT (SFA, MUFA, and PUFA) in <1 min. The proposed methodology reduces drastically the acquisition time used by the previous NMR analyses without lost in the quality of the results. The

evaluation of the different proposed CM-NMR equations (CM-NMR-1 to CM-NMR-6) have allowed the selection of the most appropriated one to obtain the best results in comparison with those obtained by the official method (GC-FID). Equations CM-NMR-5 and CM-NMR-6 have shown the best results with the three analyzed oils, showing that approximations 1 and 2 are valid. These oils represent the greatest possible variability in composition that can be found in vegetable oils. Therefore, the presented results can be extended to the study of FAT of any vegetable oil. In addition, the ^1H -NMR spectrum acquired to calculate the FAT have been used also as a fingerprint of the studied oil to obtain important information about the adulteration, preservation, oxidation, and quality of the analyzed samples.

It has been developed a method that allows a screening of large number of samples in a short time. Taking into account the new legislation in nutritional labeling in the European Union (Regulation 1169/2011), the proposed method could be an interesting and quick procedure to carry out the nutritional labeling and the quality control of oils. Our optimized conditions have been used in the automation of analysis of edible oils by NMR with good preliminary results. Further work in this direction is in progress.

Acknowledgments The authors acknowledge financial support from MICINN (grants AGL2010-19158 and CTQ2010-14936), the laboratory of animal production of the Dr Clemente López Bote for the GC-FID analysis, and the members of the CAI of NMR and RSE of the Complutense University for the cooperative collaboration.

Conflict of Interest David Castejón declares that he has no conflict of interest. Inmaculada Mateos-Aparicio declares that she has no conflict of interest. M. Dolores Molero declares that she has no conflict of interest. M. Isabel Cambero declares that she has no conflict of interest. Antonio Herrera declares that he has no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Alonso-Salces RM, Héberger K, Holland MV, Moreno-Rojas JM, Mariani C, Bellan G, Reniero F, Guillou C (2010a) Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chem* 118:956–965
- Alonso-Salces RM, Moreno-Rojas JM, Holland MV, Reniero F, Guillou C, Heberger K (2010b) Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ^1H NMR fingerprints and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ data. *J Agric Food Chem* 58:5586–5596
- Alonso-Salces RM, Holland MV, Guillou C (2011) ^1H -NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil. *Food Control* 22:2041–2046
- American Oil Chemist's Society (2009a) Official method Ce 1h-05 (09): fatty acid by capillary GC for nutritional labeling. Official methods and recommended practices of the AOCS 2009, 6th edn. AOCS, Urbana
- American Oil Chemist's Society (2009b) Official Method Ce 1–62: fatty acid composition by packed column gas chromatography. Official methods and recommended practices of the AOCS 2009, 6th edn. AOCS, Urbana
- American Oil Chemist's Society (2009c) Official Method Ch 2–91: determination of fatty acid in olive oils by capillary GLC. Official methods and recommended practices of the AOCS 2009, 6th edn. AOCS, Urbana
- Barison A, da Silva CW, Campos FR, Simonelli F, Lenz CA, Ferreira AG (2010) A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ^1H NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem* 48:642–650
- Dais P, Hatzakis E (2013) Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: a critical review. *Anal Chim Acta* 765(0):1–27
- Dayrit FM, Buenafe OE, Chainani ET, de Vera IM (2008) Analysis of monoglycerides, diglycerides, sterols, and free fatty acids in coconut (*Cocos nucifera* L.) oil by ^{31}P NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* 56:5765–5769
- European Union (2011) Official Journal of the Commission of the European Communities. Regulation no. 1169/2011
- Gao L, Sedman J, García-González DL, Ehsan S, Sprules T (2009) Voort, F.R.v.d. ^{13}C NMR as a primary method for determining saturates, *cis*- and *trans*-monounsaturates and polyunsaturates in fats and oils for nutritional labeling purposes. *Eur J Lipid Sci Technol* 111:612–622
- Goicoechea E, Guillen MD (2010) Analysis of hydroperoxides, aldehydes and epoxides by ^1H nuclear magnetic resonance in sunflower oil oxidized at 70 and 100 degrees C. *J Agric Food Chem* 58:6234–6245
- Guillen MD, Goicoechea E (2009) Oxidation of corn oil at room temperature: primary and secondary oxidation products and determination of their concentration in the oil liquid matrix from ^1H nuclear magnetic resonance data. *Food Chem* 116:183–192
- Guillén MD, Ruiz A (2003) ^1H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *Eur J Lipid Sci Technol* 105:502–507
- Guillén MD, Ruiz A (2004) Formation of hydroperoxy- and hydroxyalkenals during thermal oxidative degradation of sesame oil monitored by proton NMR. *Eur J Lipid Sci Technol* 106:680–687
- Guillen MD, Uriarte PS (2009) Contribution to further understanding of the evolution of sunflower oil submitted to frying temperature in a domestic fryer: study by ^1H nuclear magnetic resonance. *J Agric Food Chem* 57:7790–7799
- Hatzakis E, Koidis A, Boskou D, Dais P (2008) Determination of phospholipids in olive oil by ^{31}P NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* 56:6232–6240
- Hatzakis E, Agiomyrgianaki A, Kostidis S, Dais P (2011) High-resolution NMR spectroscopy: an alternative fast tool for qualitative and quantitative analysis of diacylglycerol (DAG) oil. *J Am Oil Chem Soc* 88:1695–1708
- Hidalgo FJ, Zamora R (2003) Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives. *Trends Food Sci Technol* 14:499–506
- Holzgrabe U (2010) Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 57:229–240
- Lucas-Torres C, Moreno M, Juan A, de la Hoz A, Moreno A (2011) Comparative study of the thermal and microwave oxidation in olive oil. ^{31}P -NMR quantitative determination of 1,2 and 1,3-diglycerides and other minor compounds. In: *Magnetic resonance in food science*, 332nd edn. Special publication. Royal Society of Chemistry, pp. 100–104. Cambridge, UK
- Mannina L, Segre A (2002) High resolution nuclear magnetic resonance: from chemical structure to food authenticity. *Grasas Aceites* 53:22–33
- Mannina L, Sobolev AP (2011) High resolution NMR characterization of olive oils in terms of quality, authenticity and geographical origin. *Magn Reson Chem* 49:S3–S11
- Mannina L, Patumi M, Proetti N, Bassi D, Segre AL (2001) Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field ^1H NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* 49:2687–2696
- Mannina L, D'Imperio M, Capitani D, Rezzi S, Guillou C, Mavromoustakos T, Vilchez MD, Fernandez AH, Thomas F, Aparicio R (2009) ^1H NMR-based protocol for the detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. *J Agric Food Chem* 57:11550–11556
- Mataix-Verdú J (2009) *Nutrición y alimentación humana. Vol.1, Nutrientes y alimentos*, vol 1. Ergón, Madrid
- Miyake Y, Yokomizo K, Matsuzaki N (1998) Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 75:1091–1094
- Retief L, McKenzie JM, Koch KR (2009) A novel approach to the rapid assignment of ^{13}C NMR spectra of major components of vegetable oils such as avocado, mango kernel and macadamia nut oils. *Magn Reson Chem* 47:771–781
- Rohman A, Man YBC (2011) Palm oil analysis in adulterated sesame oil using chromatography and FTIR spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol* 113:522–527
- Sacchi R, Patumi M, Fontanazza G, Barone P, Fiordiponti P, Mannina L, Rossi E, Segre A (1996) A high-field ^1H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 73:747–758
- Sedman J, Gao L, García-González D, Ehsan S, van de Voort FR (2010) Determining nutritional labeling data for fats and oils by ^1H NMR. *Eur J Lipid Sci Technol* 112:439–451
- Sega A, Zanardi I, Chiasserini L, Gabbriellini A, Bocci V, Travagli V (2010) Properties of sesame oil by detailed ^1H and ^{13}C NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value, peroxide value, and viscosity measurements. *Chem Phys Lipids* 163:148–156
- Silvagni A, Franco L, Bagno A, Rastrelli F (2010) Thermoinduced lipid oxidation of a culinary oil: a kinetic study of the oxidation products by magnetic resonance spectroscopies. *J Phys Chem A* 114:10059–10065
- Šmejkalová D, Piccolo A (2010) High-power gradient diffusion NMR spectroscopy for the rapid assessment of extra-virgin olive oil adulteration. *Food Chem* 118:153–158
- Uriarte PS, Guillén MD (2010) Formation of toxic alkylbenzenes in edible oils submitted to frying temperature: influence of oil composition in main components and heating time. *Food Res Int* 43:2161–2170
- Vigli G, Philippidis A, Spyros A, Dais P (2003) Classification of edible oils by employing ^{31}P and ^1H NMR spectroscopy in combination

- with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J Agric Food Chem* 51: 5715–5722
- Vlahov G (2009) ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy to determine fatty acid distribution in triacylglycerols of vegetables oils with “high–low oleic acid” and “high linolenic acid”. *Open Magn Reson J* 2:8–19
- Wanders AJ, Brouwer IA, Siebelink E, Katan MB (2010) Effect of a high intake of conjugated linoleic acid on lipoprotein levels in healthy human subjects. *PLoS ONE* 5:e9000

SUPPLEMENTARY DATA

(4 pages)

Manuscript entitled: Evaluation and optimization of the analysis of fatty acids types in edible oils by ^1H -NMR

David Castejón, Inmaculada Mateos-Aparicio, M. Dolores Molero, M. Isabel Cambero, Antonio Herrera

Table of contents

1)	Table S1. Previous NMR sample preparation and acquisition parameters..	p 2.
2)	Table S2. FAC values obtained with and without signal B..	p.2.
3)	Table S3. Abbreviations used in the manuscript.	p.3.
4)	Figure S1. Carbonyl region of the ^{13}C spectra from studied oils	p.4.

1) Table S1. Previous NMR sample preparation and acquisition parameters.

The table summarizes the sample preparation and acquisition parameters used in previous edible oil NMR studies.

Reference	Year	NMR frequency	Sample	Experiment	NS	TD	DS	SW (ppm)	d1	AQ	Pulse α	Exp. Time	Temperature
Sacchi et al.	1996	600 MHz	10 μ L oil+10 μ L DMSO-d+680 μ L CDCl ₃	¹ H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guillen et al.	2009	400 MHz	200 μ L oil+400 μ L CDCl ₃ (TMS)	¹ H	64	-	-	12.5	3s	3.75s	90°	13 min	25°C
Barison et al.	2010	400 MHz	200 μ L oil+400 μ L CDCl ₃ (TMS)	¹ H	8	64K	-	9.0	1s	-	-	-	20°C
Sedman et al.	2010	500 MHz	50 μ L oil+700 μ L CDCl ₃ (20 μ L TMS)	¹ H	64	64k	-	16.0	20s	4.00s	90°	-	37°C
Guillen et al.	2003	300-400 MHz	200mg oil+500 μ L CDCl ₃ (TMS)	¹ H	124	-	-	12.5	3s	3.37s	90°	-	30°C
Vigli et al.	2003	500 MHz	150mg oil+400 μ L StockSolution+15 μ L RI	¹ H	16	32k	4	12.0	2s	-	90°	-	-
Mannina et al.	2009	600 MHz	50 μ L oil+700 μ L CDCl ₃	¹ H	256	32k	16	12.0	1s	-	90	30 min	28°C

NS (number of scans), TD (time domain), SW (spectral width), DS (dummy scans), d1 (relaxation delay), AQ (acquisition time)

2) Table S2. FAC values obtained with and without signal B.

The table shows the FAC values obtained with and without (D) consideration of signal B in sunflower oil spectra.

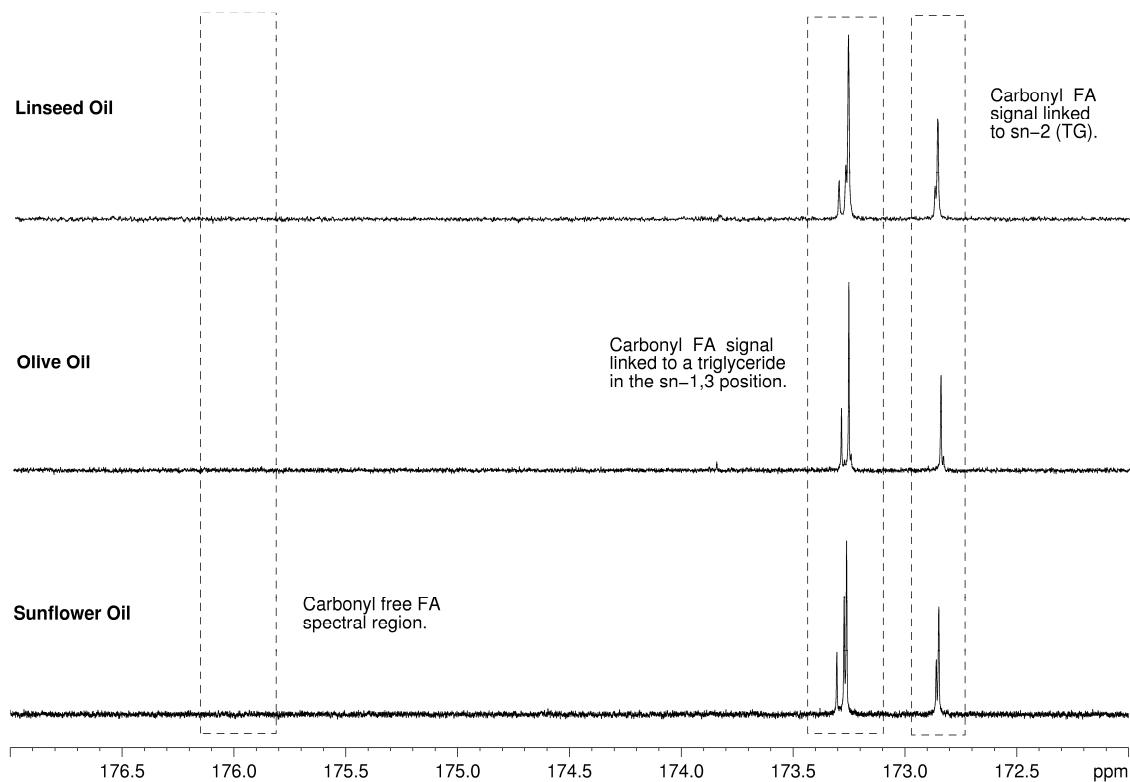
		NMR Methods										GC-FID
Sunflower		CM-NMR-1	CM-NMR-1-D	CM-NMR-2	CM-NMR-2-D	CM-NMR-3	CM-NMR-3-D	CM-NMR-4	CM-NMR-4-D	CM-NMR-5	CM-NMR-6	
	SFA	12.2 \pm 0.7 ^e	12.7 \pm 0.7 ^{de}	13.8 \pm 0.7 ^{ab}	14.1 \pm 0.7 ^a	13.0 \pm 0.1 ^{cd}	13.2 \pm 0.1 ^{bc}	13.8 \pm 0.7 ^{ab}	13.9 \pm 0.6 ^a	13.9 \pm 0.2 ^a	13.9 \pm 0.2 ^a	12.7 \pm 0.1 ^{cde}
	MUFA	34.8 \pm 0.3 ^c	33.6 \pm 0.3 ^a	34.2 \pm 0.2 ^e	34.8 \pm 0.2 ^c	34.5 \pm 0.1 ^d	35.1 \pm 0.1 ^b	34.2 \pm 0.3 ^e	34.4 \pm 0.4 ^{de}	34.1 \pm 0.1 ^e	34.1 \pm 0.9 ^e	34.5 \pm 0.2 ^d
	PUFA	53.00 \pm 0.4 ^a	54.0 \pm 0.5 ^b	52.0 \pm 0.5 ^b	51.1 \pm 0.5 ^c	52.6 \pm 0.1 ^a	51.7 \pm 0.1 ^b	52.0 \pm 0.5 ^b	51.7 \pm 0.3 ^b	52.0 \pm 0.2 ^b	52.0 \pm 0.2 ^b	52.8 \pm 0.3 ^a

Different letters in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

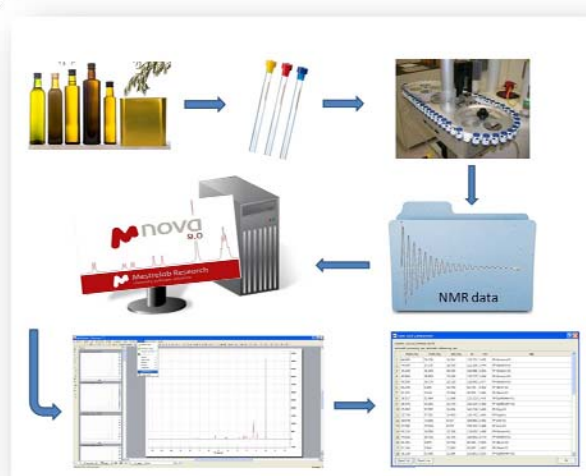
3) Table S3. Abbreviations used in the manuscript.

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
GC-FID	Gas Chromatography Flame Ionization Detection
FA	Fatty Acid
FAT	Fatty Acid Types
FAME	Fatty Acid Methyl Esters
SFA	Saturated Fatty Acid
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
FFA	Free Fatty Acid
TFA	Total Fatty Acid
TG	Triglyceride
MG	Monoglyceride
DG	Diglyceride
RSD	Relative Standard Deviation
AOCS	American Oil Chemists' Society
TMS	Tetramethylsilane
NS	Number of Scans – NMR Parameters
TD	Time Domain – NMR Parameters
SW	Spectral Width – NMR Parameters
D1	Relaxation Time – NMR Parameters
AQ	Acquisition Time – NMR Parameters
A	Pulse Angle – NMR Parameters
T1	Relaxation Delay Value – NMR Parameters
TT	Total Time – NMR Parameters
DS	Dummy Scans – NMR Parameters
$^1J_{CH}$	Coupling Constant – NMR Parameters
FID	Free Induction Delay – NMR Parameters
CM-NMR-(1,...,6)	Calculation Method of Nuclear Magnetic Resonance (1-6)

4) Figure S1. Carbonyl region of the ^{13}C spectra from studied o



^{13}C NMR analysis: Integrable ^{13}C experiments were acquired with the following parameters, SW= 250 ppm; TD= 262k; AQ= 4.17 s; d1= 16 s; TT= 20.17 s; NS= 1024; DS= 4; α = 90°.



III.1.2: AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE ^1H -RMN.

III.1.2: AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE ^1H -RMN.

En el presente trabajo se describe la evaluación y optimización necesaria para llevar a cabo la automatización del análisis de aceites vegetales mediante ^1H -RMN a bajo campo y obtener su composición de los ácidos grasos (FAC). Para ello se han desarrollado varios programas que permiten la automatización tanto del análisis como de la interpretación de los datos espectrales. Este desarrollo se ha realizado para los dos principales programas informáticos que se emplean actualmente (TopSpin y MestReNova) en el análisis de datos de RMN. Los resultados constituyen un avance en la automatización del análisis de la FAC mediante RMN en equipos asequibles de bajo campo (300 MHz). Para evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se analizaron aceites de oliva virgen extra procedentes de diferentes variedades españolas (arbequina, cornicabra, hojiblanca, manzanilla y picual). El hecho añadido de que el proceso completo, desde la mínima preparación de muestra a la obtención del informe, requiere unos pocos minutos (~ 3 min), permite concluir que el proceso automatizado constituye un método altamente competitivo para el cribado de alto rendimiento tanto en la industria como en los laboratorios de control alimentario.

Chapter III.1.2

Article

Automatic ¹H-NMR screening of fatty acid composition in edible oils.

David Castejón ^{1,†}, Pascal Fricke ^{2,†}, M. Isabel Cambero ³ and Antonio Herrera ^{4,*}

¹ CAI de RMN y RSE, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; E-Mail: dcastejon@ucm.es (D.C.)

² Department of Molecular Biophysics, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, 13125 Berlin, Germany; E-Mail: fricke@fmp-berlin.de (P.F.)

³ Dept. of Nutrition, Bromatology and Food Technology, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; E-Mail: icambero@ucm.es (M.I.C.)

⁴ Dept. of Organic Chemistry, Chemistry Faculty, Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: aherrera@ucm.es ; Tel.: +34-91-394-4205; Fax: +34-91-394-4205.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: In this work, we introduce an NMR-based screening method for the fatty acid composition analysis of edible oils. We describe the evaluation and optimization needed for the automated analysis of vegetable oils by low-field NMR to obtain the fatty acid composition (FAC). To achieve this, two scripts, which automatically analyze and interpret the spectral data, were developed. The objective of this work was to drive forward the automated analysis of the FAC by NMR. Due to the fact that this protocol can be carried out at low field and that the complete process from sample preparation to printing the report only takes about 3 minutes, this approach is promising to become a fundamental technique for high-throughput screening. To demonstrate the applicability of this method, the fatty acid composition of Extra Virgin Olive Oils from various Spanish olive varieties (arbequina, cornicabra, hojiblanca, manzanilla, and picual) was determined by ¹H NMR spectroscopy according to this protocol.

Keywords: NMR spectroscopy; edible oil; fatty acid composition; iodine value; automatic analysis; MestreNova; TopSpin.

1. Introduction

Over the past years, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) has proven to be an efficient technique to determine the composition of fatty acids in a simple and quick manner [1]. There is a high demand for this information as the fatty acid profile is used to classify the quality of edible oils [2] and as an indicator for the detection of adulteration [3]. Furthermore, printing the composition on the label of edible oils is obligatory in the European Union since December 2014 (*Regulation 1169/2011*) [4].

Traditionally, NMR has been an analytical technique used for the verification and elucidation of molecular structures and for the determination of purity. But due to the needs of emerging fields like metabolomics, NMR has evolved rapidly to be a screening technique for the analysis of mixtures. This development has been facilitated by the technical advances in the field of automatic sample changers, the quality of NMR spectrometers, and by the development of new software for spectral data processing. The main applications for NMR are drug discovery [5] and clinical diagnostics [6]. Developing a totally automated system, which comprises the preparation, the acquisition of spectral data, the processing, the analysis, and the interpretation of the data, these advances in mixture analysis have recently been successfully transferred to the analysis of fruit juice [7,8].

In this work, we describe the evaluation and optimization needed for the automated analysis of vegetable oils by low-field NMR to obtain the fatty acid composition (FAC). To achieve this, two scripts, which automatically analyze and interpret the spectral data, were developed. To ensure a widespread applicability, they were written for the two most important software programs used for the analysis of NMR data (Bruker TopSpin and Mestrelab MestReNova). The objective of this work was to drive forward the automated analysis of the FAC by NMR. Due to the fact that this protocol can be carried out at low field (300 MHz) and that the complete process from sample preparation to printing the report only takes 3-4 minutes, this approach is promising to become a fundamental technique for high-throughput screening in both, the industry and in food control laboratories.

2. Experimental Section

Several types of oils were used during the study. Firstly, a set of commercial oils with differing FAC was selected: olive oil, sunflower oil, linseed oil, sesame oil, and soy oil. Secondly, a set of extra virgin olive oils from differing Spanish olive varieties was chosen: arbequina, cornicabra, hojiblanca, manzanilla, and picual. These samples were obtained from different olive oil companies (Hojiblanca, Casas de Hualdo, and Finca la Redonda).

2.1 NMR analysis

For the sample preparation of all types of edible oils, only the addition of deuterated solvent was required as a single step. 600 μL of CDCl_3 (containing 1% TMS) and 50 μL of oil were placed in a 5 mm NMR tube and mixed thoroughly during 10 s. The spectra were acquired using a Bruker DPX 300 MHz NMR spectrometer, equipped with a BACS-60 robotic autosampler (which allows for fully automated analysis of up to 60 samples at a time) and a 5 mm Z-gradient QNP probe. For the acquisition, 32 K complex points were recorded, the spectral width was set to 12 ppm, the frequency offset was set to 5 ppm, the recycle delay was set to 4 s, the acquisition time was 4.56 s, the excitation

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.2*, 1-11.

pulse was a 90° hard pulse, the number of scans (NS) was set to 8 and the number of dummy scans was equal to 2. The total experimental time was 1 min and 26 s. A temperature of 30 °C was chosen for the experiments. The data were acquired automatically using the software ICON-NMR (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany).

The resulting spectra were processed manually and automatically with the software MestreNova 9.0.1 (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spain) and Topspin 2.1 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). No window functions were applied. The chemical shift scale was referenced using the signal of the TMS (0 ppm).

2.2 Fatty acid composition.

The percentage of fatty acids was determined using the integrals of certain resonances in the ¹H NMR spectrum. The following equations developed in previous work[1] were used:

$$[\text{SFA} = 4 \cdot \text{A} + 4 \cdot \text{B} - 3 \cdot \text{E} / 6 \cdot \text{F}] \quad (1)$$

$$[\text{MUFA} = 4 \cdot \text{B} + 3 \cdot \text{E} - 6 \cdot \text{H} / 6 \cdot \text{F}] \quad (2)$$

$$[\text{PUFA} = 3 \cdot \text{G} - 2 \cdot \text{B} / 3 \cdot \text{F}] \quad (3)$$

In these equations, SFA refers to Saturated Fatty Acids, MUFA to Mono-Unsaturated FA, PUFA to Poly-Unsaturated FA, and the letters A-J to the NMR oil signals described in Figure 1. To calculate the total FA value, these equations consider that each acyl chain contains two methylenic protons in α-position to the carboxyl group (signal F).

2.3 Determination of the iodine value.

The determination of the iodine value (IV) was based on the ¹H NMR data by a previously developed approach [9] which proved that the iodine value is related to the percentage of olefinic protons (%OP) according to the equation:

$$[\text{IV} = 10.54 + 13.39 \cdot \% \text{OP}] \quad (4)$$

The percentage of olefinic protons (%OP) in the oil can be directly determined from the area of signal J in Figure 1.

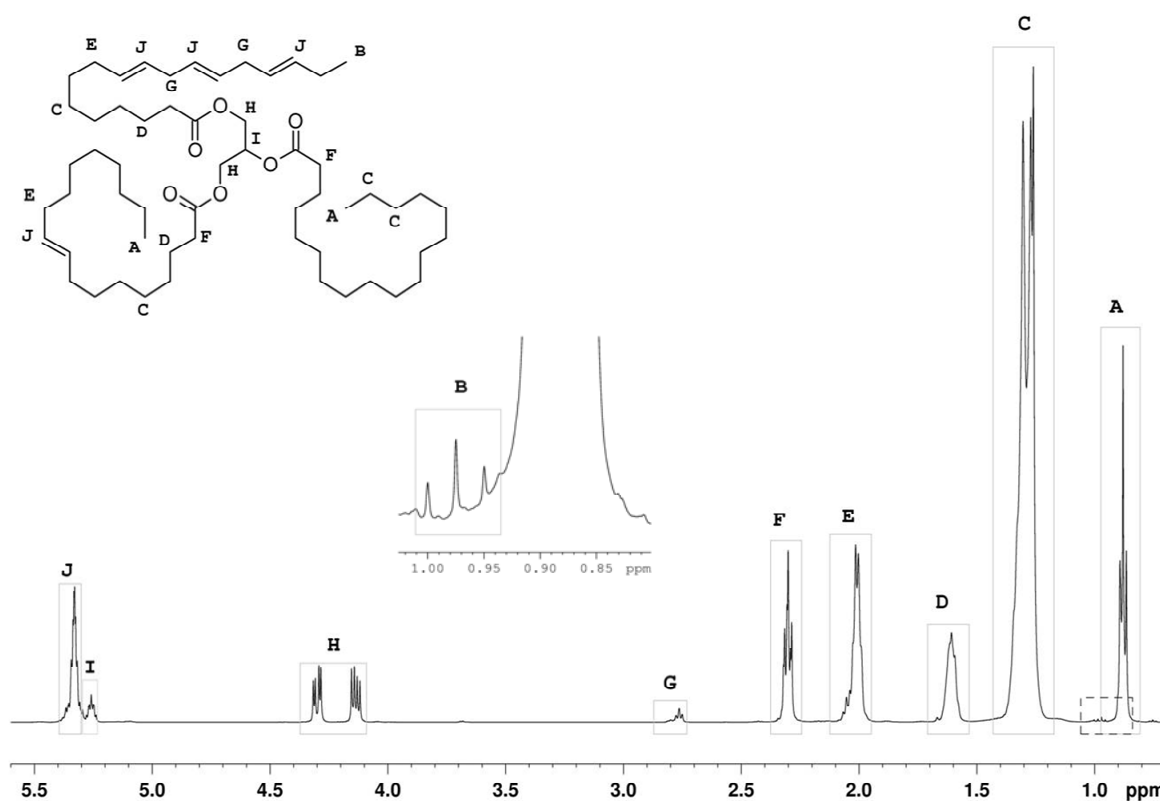
3. Results and Discussion

3.1 Optimization and evaluation of the FAC by NMR experiments at 300 MHz

This work is based on previous results [1] which proved the accuracy of the determination of the fatty acid composition using ¹H NMR spectra acquired at 500 MHz (in less than a minute) in comparison with the standard method (determination by gas chromatography with flame ionization detection, GC-FID [10]). In this work, we evaluate the possibility to achieve similar results at an even lower magnetic field (7 T; 300 MHz). These instruments are more widely available as they have less demanding requirements in terms of hardware installation and are considerably cheaper. A better availability of the instruments to carry out the protocol presented here would also result in a more

widespread applicability of this approach as well in the field of food control laboratories as in food industry. To carry out this evaluation, the same acceptance criteria for the NMR analyses as in previous works was used (smallest peak to be integrated should present a signal to noise ratio of at least 250:1, spectral resolution of at least the half of the line-width at half-height). According to these criteria, the parameters described in the “Materials and Methods” section were selected (NS = 8 resulted in a $S/N = 567.33 \pm 17.31$ for the signal B in the picual oil, whose signal was selected as it is characteristic for linolenic acid and only present in certain oils; the line-width at half-height of the TMS signal was 0.68 Hz, the spectral resolution with the selected parameters was 0.11 Hz). Figure 1 shows the ^1H NMR spectrum acquired using the aforementioned conditions and the assignment of the fatty acid signals.

Figure 1. ^1H NMR spectrum of olive oil with corresponding assignment of the signals of the glycerol unit and the fatty acid chains. The region from 1.03-0.82 ppm is shown in an expansion. The figure also shows the structure and nomenclature used for the glycerol moiety and the different fatty acids protons.

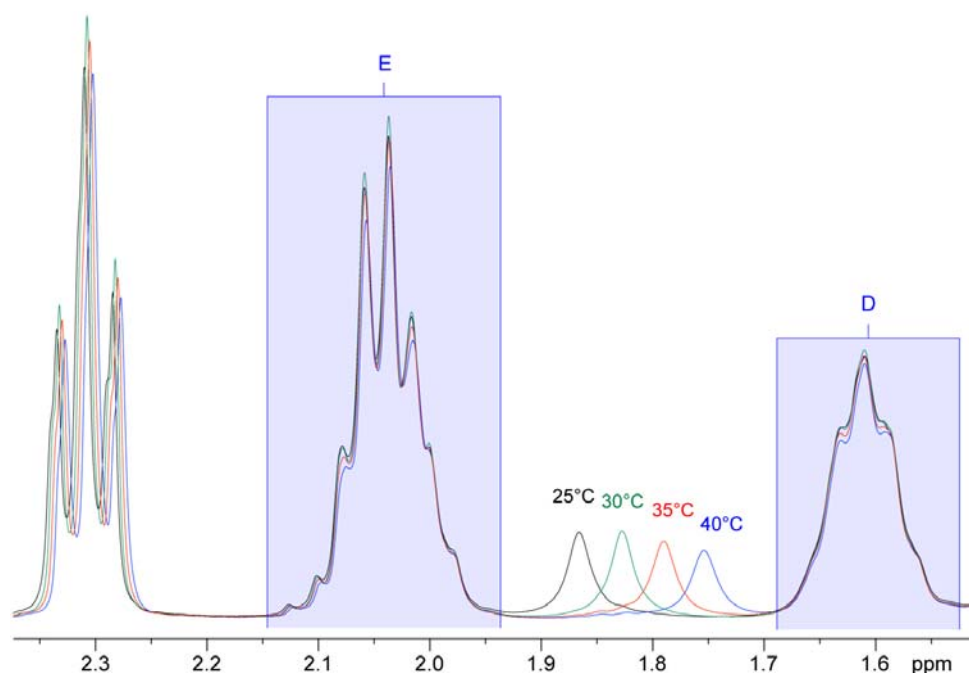


As a consequence of changing to a lower magnetic field, certain factors needed to be taken into account when selecting the integration regions: The influence of the ^{13}C satellites changes, as, for example, working at 300 MHz, the ^{13}C satellite of signal A does not influence the integral of signal B as it is outside its region, which is not the case at higher fields [1,11]. Furthermore, the effect of the signal of the residual water was evaluated. As this signal is temperature dependent, the experiments were carried out at different temperatures to monitor its change in chemical shift. Figure 2 shows the

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.2*, 1-11.

variation of the residual water signal at different temperatures. To avoid any influences on the integrals, a temperature of 30°C was chosen.

Figure 2. Temperature series of 300 MHz ^1H NMR spectra of soy oil in CDCl_3 referenced to internal TMS. The spectra were acquired at 4 different temperatures and the results were overlaid to illustrate the dependence of the water signal chemical shift on the sample temperature.



The fatty acid composition was carried out according to the formulae described in M&M and it was observed that the results were satisfying (no significant differences – $p < 0.05$ – in comparison with the results obtained from the same oils at 500 MHz using the previously described method). Then it was evaluated if the automatic analysis permits to obtain the same values for the FAC as those obtained from manual analysis (where mostly shimming is the determining factor). The obtained results did not show significant differences ($p < 0.05$) between the manual and automatic analysis using the same samples. The differences between the results from the manually processed spectra (phase correction, baseline correction, referencing to 0 ppm) and the automatically processed spectra were not significant ($p < 0.05$), either.

Once it was proven that the results of the calculation of the FAC were satisfying at low field and using automatic acquisition and processing, programs were developed to carry out the automation. The automatic process starts after placing the samples into the autosampler and ends with displaying the final report containing the FAC for each of the analyzed oils.

3.2 Automated Analysis of the FAC via automatic ^1H NMR acquisition and analysis at 300 MHz.

The aim was that a possibly large amount of acquired spectra (for example via an autosampler) should be processed and analyzed (integration, calculation of fatty acid composition) in a completely automatic manner. The desired result is a table showing the fatty acid composition (in %) for each

measured sample. By achieving this, a high throughput of samples can be obtained and the whole process would require minimal attendance.

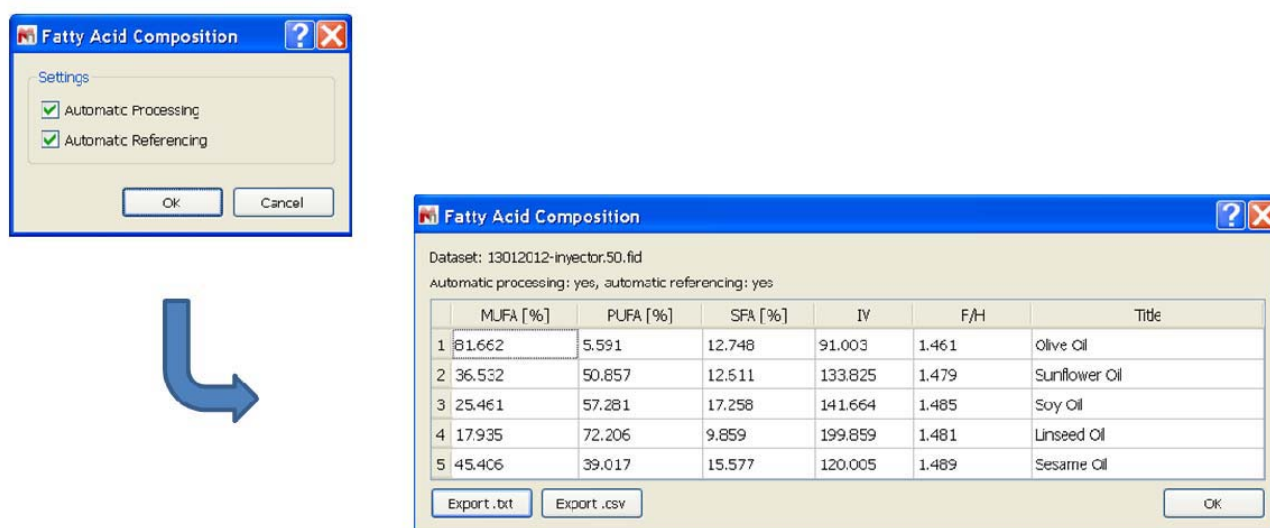
It was chosen to write scripts that carry out the whole automation process. The scripts were written for the two most widely used programs for NMR data processing: MestReNova [12] and TopSpin [13].

3.2.1 MestReNova Script.

The NMR processing program MestReNova supports extending its capabilities and implementing automated workflows via an ECMAScript-based API to access the core functionality of the program and to generate user output.

This interface was used to write a script, which provides the automatic analysis function for proton spectra of edible oils using MestReNova as a basis. This extends the availability of the automated fatty acid analysis to all platforms MestReNova runs on (Windows, GNU/Linux, Mac OS X) and to all data formats MestReNova can read (all major vendors / models / formats). This versatility also makes this software one of the most widely used worldwide [12]. The script expects all to-be-processed spectra to be opened; it does not matter whether they are on different pages or within the same page, they only must be part of the same document. The first dialog upon executing the script expects the user to specify whether the spectra shall be automatically processed (i.e. automatic phase correction and automatic baseline correction) and whether the spectra shall be automatically referenced (against TMS). Both options are by default activated and can be unchecked, for example if manual corrections are desired or if the spectra were acquired without TMS added. After accepting this dialog, all the processing, the integration, and the calculation are done automatically and the results are shown in a dialog in form of a table (Figure 3).

Figure 3. Result window shown in MestReNova after completing the automatic analysis.

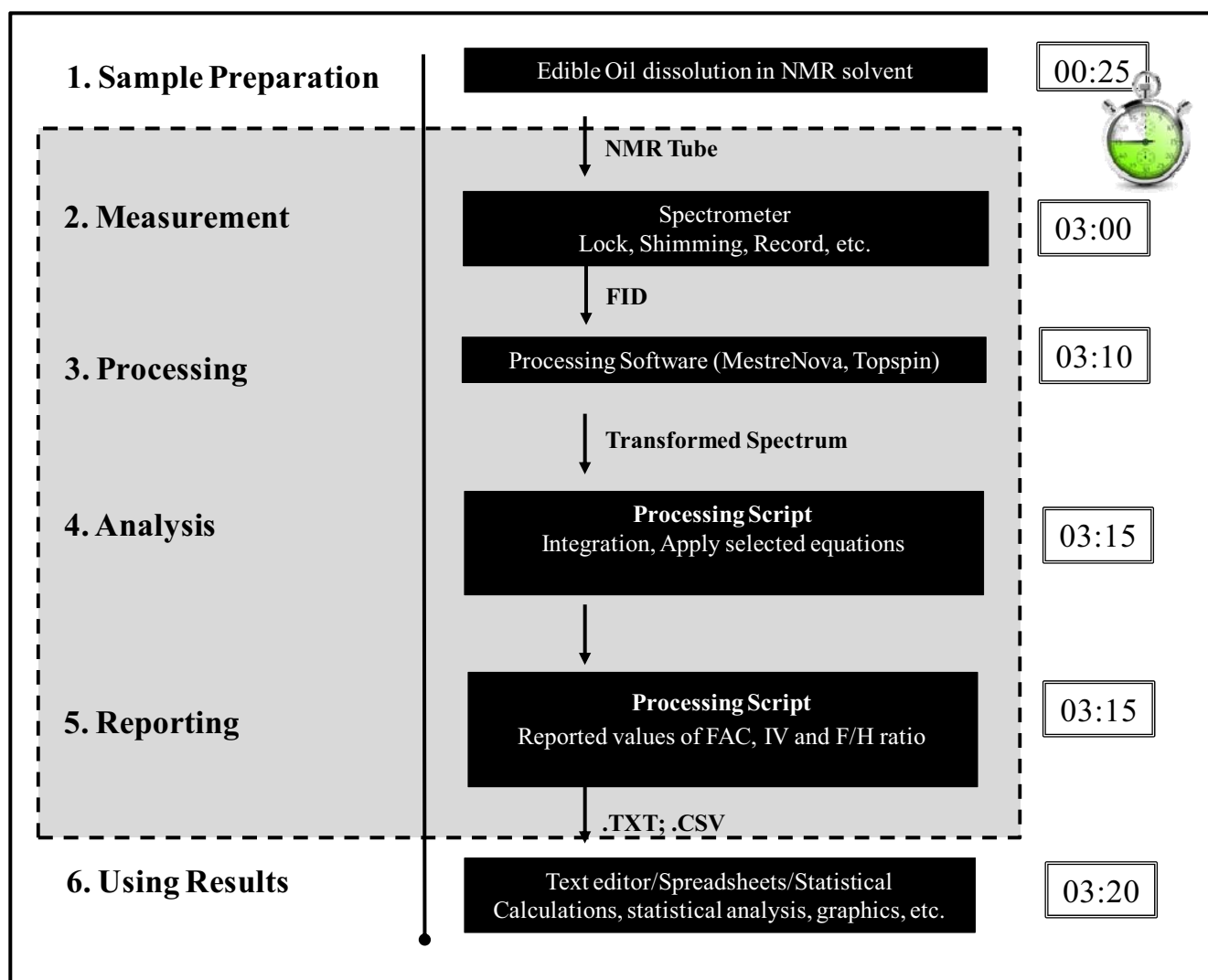


The results table generated by this script also contains the iodine value (IV) of all oils by evaluating the signal J (see M&M). The IV shows the degree of unsaturation of the oils and often has been used to predict the chemical and physical properties of fats and oils, such as oxidative stability and melting points [13]. Additionally, the table contains the F/H ratio. This ratio has been proposed as a single way

D. Castejón et. al. **2015**, III.1.2, 1-11.

to validate the approximation used to calculate the FAC [1]. Its value should be close to 1.50, since the signal F (CH₂ in alpha-position to the carboxylic acid) represents six protons and the signal H (CH₂ from *sn*-1,3 TG) represents four protons. A value different from 1.50 can be explained by a higher concentration of diglycerides, monoglycerides, and/or free fatty acids. That is why the F/H ratio indicates whether the approximations are correct and therefore produce trustworthy FAC values. Anomalous values for F/H would indicate that this is not the case and that the FAC values are possibly erroneous.

Figure 4. Scheme illustrating the general workflow for the automatic edible oil analysis: (1) Performing the (quantitative) NMR experiment itself and recording the FID. (2) Transforming the FID with FT to a spectrum and applying all associated processing steps (apodization, phasing, baseline correction, etc.) (3) Using the processing script to extract the information from the spectra (4) Using the information provided by the processing script for plotting or further analysis, such as statistics.



The scripts (MestReNova and TopSpin) were evaluated with a set of edible oils (olive, sunflower, soy, linseed, and sesame oils) that have a largely differing fatty acid composition. The results have shown no significant differences to those obtained after manual FAC calculation. The scripts also offer the user the possibility to export the calculated data as a human-readable text file (.txt) or as comma-separated-values (.csv). The MestReNova script is available in the on line supplementary data (Section S1).

3.2.2 TopSpin AU program.

In our Bruker-equipped NMR laboratories the spectra acquisition software used is TopSpin. This software allows the implementation of custom automatization workflows via several different programming interfaces like the Python interface, the AU programming interface or traditional macros. AU programs are compatible with a wide range of TopSpin versions (from the earliest to the newest) and allow a high level of customization and interaction with the user. Because of these reasons and because of the widespread availability of TopSpin, this programming interface was also chosen as a basis for the implementation of the automatic analysis function for proton spectra of edible oils. The Topspin AU program is described in supplementary data (Section S2 y S3).

3.2.3 Total Automated Analysis of the FAC.

Figure 4 shows a scheme illustrating the whole process from sample preparation to exporting the obtained data and includes estimations on the duration of each of the individual steps. With the protocol proposed here, it is possible to obtain the FAC, the IV, and the F/H ratio in about 3 min. The only not yet automated steps are the sample preparation and the post-processing of the data (statistics, diagrams). Although these steps can be automated, this was out of the scope of the work presented here. The grey box in Figure 4 represents the automated workflow.

3.3 Automatic characterization of the FAC in Extra Virgen Olive Oils (EVOO).

The fatty acid composition of Extra Virgin Olive Oils from various Spanish olive varieties (arbequina, cornicabra, hojiblanca, manzanilla, and picual) was evaluated by the ^1H NMR automatic analysis described above. The data indicated that all the investigated olive oils had the expected EVOO fatty acid composition, with oleic acid being the most abundant for all the varieties (Table 1). According to the literature [16], the EVOO from arbequina has the highest PUFA concentration while the EVOO from picual has the lowest. The results did not show significant differences between the intra-sample standard deviation (3 consecutive experiments using the same sample) and the inter-sample standard deviation (3 samples of each oil acquired randomly).

4. Conclusions

It could be shown that NMR is a powerful tool to characterize edible oils in many different ways:

^1H NMR spectra allow the reliable quantitation of the fatty acid content with respect to monounsaturated fatty acids (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA), and saturated fatty acids (SFA). This process is so straightforward that even a completely automatic processing and analysis of

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.2*, 1-11.

the spectra is possible. A MestReNova script and a TopSpin AU program were created to automatically derive these values for a (possibly) large set of raw NMR data. Both scripts ensure compatibility on many different platforms.

Table 1. Mean values and standard deviations of the fatty acid compositions (%) of the different Spanish extra virgin olive oils (EVOO).

		MUFA(%)	PUFA(%)	SFA(%)	IV	F/H
Arbequina	Sample 1	77.58 ± 0.05	8.19 ± 0.02	14.23 ± 0.03	91.91 ± 0.03	1.48 ± 0.00
	Sample 2	77.52 ± 0.10	8.25 ± 0.07	14.23 ± 0.03	92.03 ± 0.02	1.48 ± 0.00
	Sample 3	77.63 ± 0.05	8.26 ± 0.03	14.11 ± 0.04	92.15 ± 0.08	1.47 ± 0.00
	Mean value	77.58 ± 0.09	8.23 ± 0.04	14.19 ± 0.06	92.03 ± 0.10	1.47 ± 0.00
Cornicabra	Sample 1	85.16 ± 0.21	4.05 ± 0.15	10.78 ± 0.06	89.70 ± 0.06	1.47 ± 0.00
	Sample 2	85.03 ± 0.13	4.12 ± 0.10	10.86 ± 0.04	89.80 ± 0.11	1.47 ± 0.00
	Sample 3	85.53 ± 0.20	3.84 ± 0.15	10.63 ± 0.05	89.63 ± 0.04	1.47 ± 0.00
	Mean value	85.24 ± 0.27	4.00 ± 0.18	10.76 ± 0.09	89.71 ± 0.10	1.47 ± 0.00
Hojiblanca	Sample 1	84.30 ± 0.08	6.76 ± 0.03	8.94 ± 0.05	93.35 ± 0.02	1.48 ± 0.00
	Sample 2	84.06 ± 0.08	6.92 ± 0.10	9.02 ± 0.05	93.20 ± 0.01	1.48 ± 0.00
	Sample 3	84.25 ± 0.10	6.90 ± 0.07	8.85 ± 0.04	93.16 ± 0.03	1.47 ± 0.00
	Mean value	84.20 ± 0.10	6.86 ± 0.08	8.94 ± 0.05	93.24 ± 0.08	1.48 ± 0.00
Manzanilla	Sample 1	82.76 ± 0.08	3.13 ± 0.03	14.11 ± 0.06	85.88 ± 0.08	1.47 ± 0.00
	Sample 2	82.28 ± 0.13	3.39 ± 0.12	14.33 ± 0.06	86.16 ± 0.10	1.47 ± 0.00
	Sample 3	82.55 ± 0.09	3.22 ± 0.08	14.23 ± 0.01	86.05 ± 0.02	1.47 ± 0.00
	Mean value	82.53 ± 0.11	3.25 ± 0.09	14.22 ± 0.06	86.03 ± 0.12	1.47 ± 0.00
Picual	Sample 1	85.13 ± 0.13	2.45 ± 0.10	12.42 ± 0.04	89.42 ± 0.05	1.48 ± 0.00
	Sample 2	85.07 ± 0.04	2.50 ± 0.05	12.43 ± 0.01	89.37 ± 0.04	1.48 ± 0.00
	Sample 3	85.04 ± 0.06	2.52 ± 0.05	12.43 ± 0.00	89.51 ± 0.04	1.48 ± 0.00
	Mean value	85.08 ± 0.08	2.49 ± 0.07	12.43 ± 0.02	89.43 ± 0.07	1.48 ± 0.00

It can be concluded that NMR spectroscopy surpasses the established investigation methods (gas chromatography) for vegetable oils with respect to analysis time and sample preparation. Its use can ease and improve the characterization process significantly.

Supplementary Materials

Supplemental Material may be found in the online version of this article.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from MICINN (grants AGL2010-19158 and CTQ2010-14936), and the cooperative collaboration with the members of the CAI of NMR and RSE (UCM) and

with Agustín Barba (Developer, Mestrelab). Pascal Fricke acknowledges EC for the financial support for an Erasmus Mundus Master Course.

Author Contributions

David Castejón, Pascal Fricke, M. Isabel Cambero and Antonio Herrera conceived and designed the experiments; David Castejón and Pascal Fricke performed the experiments; David Castejón, Pascal Fricke and Antonio Herrera analyzed the data; M. Isabel Cambero contributed reagents/materials/analysis tools; David Castejón, Pascal Fricke, M. Isabel Cambero and Antonio Herrera wrote the paper; all authors contributed critical revision of the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

- [1] Castejón, D.; Mateos-Aparicio, I.; Molero, M.D.; Cambero, M.I.; Herrera, A. Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by ¹H-NMR. *Food Analytical Methods* **2014**, *7*, 1285-1297.
- [2] Jabeur, H.; Zribi, A.; Makni, J.; Rebai, A.; Abdelhedi, R.; Bouaziz, M. Detection of Chemlali Extra-Virgin Olive Oil Adulteration Mixed with Soybean Oil, Corn Oil, and Sunflower Oil by using GC and HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4893-4904.
- [3] Ai, F.; Bin, J.; Zhang, Z.; Huang, J.; Wang, J.; Liang, Y.; Yu, L.; Yang, Z. Application of Random Forests to Select Premium Quality Vegetable Oils by their Fatty Acid Composition. *Food Chem.* **2014**, *143*, 472-478.
- [4] European Union. Official Journal of the Commission of the European Communities. Regulation no.1169/2011. **2011**.
- [5] Powers, R. The Current State of Drug Discovery and a Potential Role for NMR Metabolomics: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5860-5870.
- [6] Simmler, C.; Napolitano, J.G.; McAlpine, J.B.; Chen, S.; Pauli, G.F. Universal Quantitative NMR Analysis of Complex Natural Samples. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *25*, 51-59.
- [7] Monakhova, Y.B.; Schütz, B.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Kuballa, T.; Hahn, H.; Lachenmeier, D.W. Validation Studies for Multicomponent Quantitative NMR Analysis: The Example of Apple Fruit Juice. *Accreditation and Quality Assurance* **2014**, *19*, 17-29.
- [8] Spraul, M.; Schütz, B.; Rinke, P.; Koswig, S.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Mörtter, M.; Fang, F.; Marx, U.; Minoja, A. NMR-Based Multi Parametric Quality Control of Fruit Juices: SGF Profiling. *Nutrients* **2009**, *1*, 148-155.
- [9] Guillén, M.D.; Ruiz, A. Rapid Simultaneous Determination by Proton NMR of Unsaturation and Composition of Acyl Groups in Vegetable Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, *105*, 688-696.

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.2*, 1-11.

[10] American Oil Chemist's Society (AOCS). Official Method Ce 1h-05 (09): Fatty Acid by Capillary GC for Nutritional Labeling. Official methods and recommended practices of the AOCS **2009**, *6a ed. Urbana*.

[11] Mannina, L.; Sobolev, A.P. High Resolution NMR Characterization of Olive Oils in Terms of Quality, Authenticity and Geographical Origin. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, S3-S11.

[12] Bernstein, M.A.; Sýkora, S.; Peng, C.; Barba, A.; Cobas, C. Optimization and Automation of Quantitative NMR Data Extraction. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5778-5786.

[13] Clos II, L.J.; Jofre, M.F.; Ellinger, J.J.; Westler, W.M.; Markley, J.L. NMRbot: Python Scripts Enable High-Throughput Data Collection on Current Bruker BioSpin NMR Spectrometers. *Metabolomics* **2013**, *9*, 558-563.

[14] Izquierdo-García, J.L.; Villa, P.; Kyriazis, A.; del Puerto-Nevado, L.; Pérez-Rial, S.; Rodríguez, I.; Hernandez, N.; Ruiz-Cabello, J. Descriptive Review of Current NMR-Based Metabolomic Data Analysis Packages. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **2011**, *59*, 263-270.

[15] Miyake, Y.; Yokomizo, K.; Matsuzaki, N. Rapid Determination of Iodine Value by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 15-19.

[16] Reboredo-Rodríguez, P.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Fregapane, G.; Salvador, M. D.; Simal-Gándara, J. Characterisation of extra virgin olive oils from Galician autochthonous varieties and their co-crushings with Arbequina and Picual cv. *Food chem.* **2015**, *176*, 493-503.

SUPPLEMENTARY DATA

(4 pages)

Manuscript entitled: Automatic ^1H -NMR screening of fatty acid composition in edible oils.

David Castejón, Pascal Fricke, M. Isabel cambero, Antonio Herrera

Table of contents

1) Section S1. The MestReNova script	p 2.
2) Section S2. Topspin AU program	p 2.
3) Section S3. Topspin AU program description	p 2.

1) Section S1. MestReNova script.

The MestReNova script is available in:

https://drive.google.com/drive/folders/0B0Zu2ZtVnB_hdFM5LUg4eGQzMGM

2) Section S2. Topspin AU program.

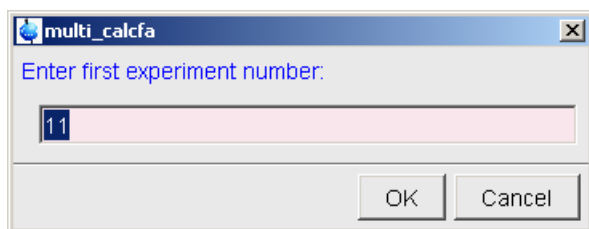
The Topspin AU program is available in:

https://drive.google.com/drive/folders/0B0Zu2ZtVnB_hdFM5LUg4eGQzMGM

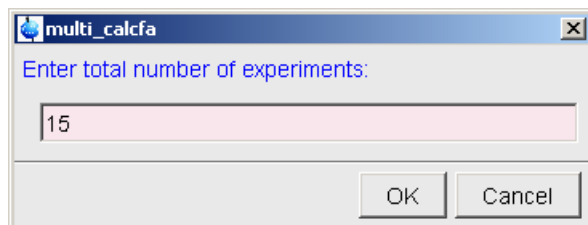
3) Section S3. Topspin AU program Description.

TopSpin AU programs are programs written using the C-language and can contain usual TopSpin commands in the form of macros. They allow access to the acquired data and can be used to process and change them; furthermore it is possible to interact with the user to influence the behavior of the program or to pass commands/parameters to the program. AU programs can be executed by simply entering the name of the program in the TopSpin command line and are compiled to form executable binaries whenever they are executed for the first time or their underlying source code gets changed. The latter, however, is a transparent process and does not require any special user interaction.

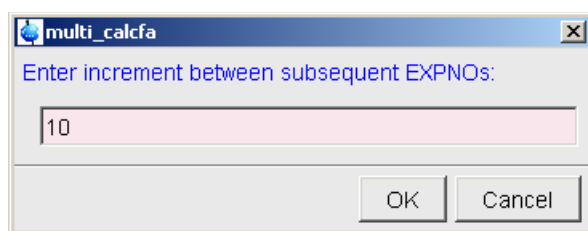
The program is initiated using the command ***multi_calcfa***. It expects the spectra (i.e oil samples) to be stored in subsequent experiment numbers (EXPNO) of a dataset with the same name. This is the standard situation if spectra were acquired using an autosampler. The program asks the user to enter the first experiment number which is supposed to be processed (Figure S1.A). Furthermore, it asks for the total of number of experiments which shall be processed (Figure S1.B) and the increment between subsequent experiment numbers (Figure S1.C). The latter takes into account that, using an autosampler, the experiment numbers between two subsequent samples are increased to the next tens, so that the increment is in many cases 10.



(A) First EXPNO to be processed



(B) Total number of EXPNOs to be processed



(C) Increment between EXPNOs

Figure S1: Dialogs of the TopSpin AU program which are needed for the necessary user input.

The following steps of the execution of the program work without any user attendance and are completed within seconds. In the pdata/1/ folder of the first experiment number two files are written: *multi_calcfa_result.txt* and *multi_calcfa_result.csv*. The first is a human readable text file which is also presented after the successful completion of the AU program (see Table S1). It contains a table with all *processed* experiment numbers, the fatty acid concentrations and the corresponding title of the sample. The latter is a comma separated value file which contains the same results, but it can be easily imported by programs like Origin or Excel to ease further work with the obtained data and to assure a greater compatibility.

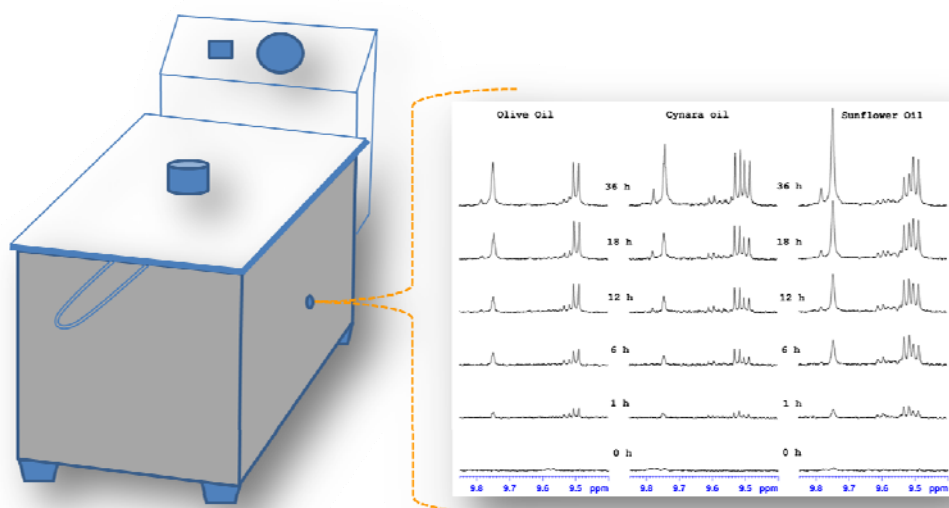
Table S1: Sample output taken from the generated .txt-file of the TopSpin AU program. Here, 15 samples of different oils (olive, sunflower, soy, linseed and sesame oil) were analysed.

```
*****
Fatty acid composition normalised to 100%
*****
Dataset: 13012012-injector
Automatic processing: yes, automatic referencing: no
For EXPNOs from 11 to 151 (increment: 10), PROCNO: 1
*****
```

EXPNO	MUFA(%)	PUFA(%)	SFA(%)	TITLE
11	80.471	3.826	15.703	PF-OliveV-01
21	37.138	48.227	14.635	PF-SunflowerV-01
31	27.062	53.522	19.416	PF-Soja-01
41	22.814	65.664	11.522	PF-Lino-01
51	46.621	34.709	18.670	PF-Sesamo-01
61	80.510	3.618	15.872	PF-OliveV-02
71	37.236	47.648	15.116	PF-SunflowerV-02
81	26.281	54.813	18.906	PF-Soja-02
91	22.768	65.847	11.386	PF-Lino-02
101	46.777	34.340	18.882	PF-Sesamo-02
111	80.403	3.800	15.797	PF-OliveV-03
121	37.366	47.372	15.262	PF-SunflowerV-03
131	26.702	54.239	19.058	PF-Soja-03
141	22.873	65.794	11.333	PF-Lino-03
151	46.527	34.802	18.670	PF-Sesamo-03

Besides this 'standard workflow', the program supports three command line arguments, which can simply be appended to the name of the program to take effect. The first one is '*noproc*', which deactivates all automatic processing. In this case, the program expects all datasets to be already fully processed. This is especially handy if one wants to achieve better results than using the automatic phase and baseline correction algorithms. The second one is '*nosref*', which suppresses the automatic chemical shift referencing to the TMS peak. This is useful if the computer used to process the spectra is not controlling the spectrometer and does therefore not have a valid lock-table available, or if the spectra were acquired without TMS added. The last command-line argument is simply represented by an integer number. This number refers to the processing number which is supposed to be used. If none is given, 1 is the default. The purpose of this argument is to give the user the possibility to store the automatic processing of the AU program in a higher processing number (PROCNO) to avoid that manually processed data is overwritten; or to manually process data using a higher processing number so that different results can be counter-checked.

The AU program automatically checks the user input and the data to avoid misbehavior and to inform the user on what input is wrong and what kind of input is expected instead. The calculated percentages are normalized to sum up to 100 %.



III.1.3: MONITORIZACIÓN DEL PROCESO DE OXIDACIÓN DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE ^1H -RMN Y REE.

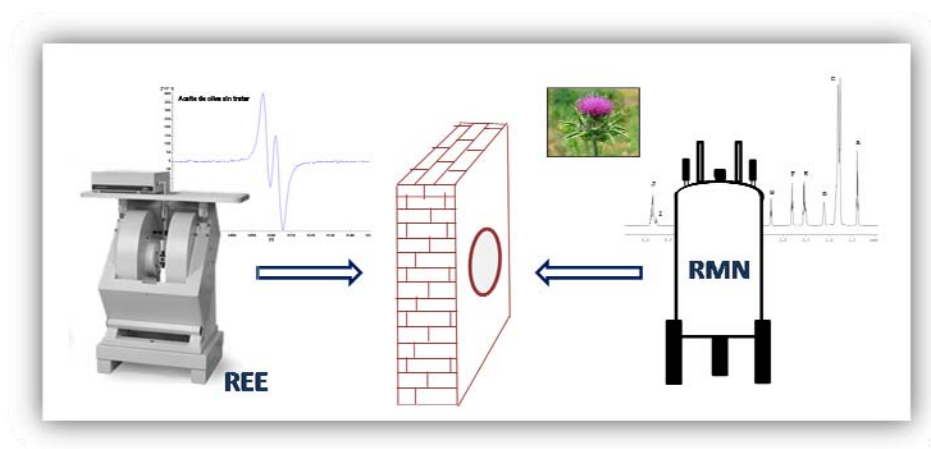
III.1.3: MONITORIZACIÓN DEL PROCESO DE OXIDACIÓN DE ACEITES VEGETALES MEDIANTE ^1H -RMN Y REE.

Cynara cardunculus L. comúnmente llamado “Cardo”, es una especie mediterránea que crece de forma natural en regiones áridas con alta temperatura y salinidad. El cardo se ha cultivado como verdura desde la antigüedad y su uso representa un ingrediente notable de la dieta mediterránea. En la actualidad su producción va dirigida principalmente al mercado energético. La biomasa aérea como material lignocelulósico se utiliza directamente para la calefacción o para la generación de energía eléctrica, mientras que las semillas, que poseen un interesante contenido en aceite (22-29 %), se utilizan en la producción de biodiesel. El aceite de cardo cultivado presenta un rendimiento industrial interesante y un perfil de ácidos grasos similar al del aceite de girasol, por lo que podría plantearse su revalorización como aceite comestible alternativo. En el presente trabajo se realizó un estudio comparativo del comportamiento del aceite de cardo sometido a un proceso oxidativo de fritura frente a los aceites vegetales más utilizados en la cuenca mediterránea para freír, como son el aceite de girasol y el de oliva. Los aceites se calentaron a 170 °C durante 36 horas y se tomaron progresivamente muestras a 0, 1, 6, 12, 18 y 36 horas. La composición y degradación de los ácidos grasos, así como la aparición de compuestos secundarios se evaluó a través del espectro de ^1H -RMN. La estabilidad frente al proceso de termooxidación se estudió mediante resonancia de espín electrónico (REE) y en función del índice de iodo (IV), obtenido a partir del espectro de ^1H RMN.

Durante el proceso de oxidación, los aceites de girasol y de cardo sufrieron una disminución de su contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y un aumento de los ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA). Sin embargo, en el aceite de oliva, la disminución de PUFA se asoció con una disminución de MUFA y un aumento de SFA. La formación de compuestos secundarios de degradación, como aldehídos y epóxidos, fue detectada desde la primera hora de calentamiento. El aumento del porcentaje de aldehídos con el calentamiento fue mayor en el aceite de girasol, seguido del aceite de cardo y de oliva. Por el contrario, el incremento del porcentaje de epóxidos fue mayor en el aceite de oliva y en el aceite de girasol. En la estimación de la estabilidad oxidativa mediante REE, el aceite de girasol y el de

cardo presentaron un comportamiento muy similar. Fue posible establecer una correlación significativa ($R^2=0.84$, $p < 0.05$) entre los resultados de REE y el porcentaje de aldehídos totales obtenidos mediante RMN.

La ^1H -RMN ha demostrado ser una técnica rápida y eficaz para monitorizar los cambios asociados al proceso de fritura a través del análisis de la composición de ácidos grasos y el estudio de los compuestos de degradación oxidativa. El análisis preliminar mediante componentes principales (PCA) del conjunto de datos de RMN de los aceites fritos, permitió observar una clasificación de los aceites en función del tiempo de fritura (PC1). También permitió distinguir los aceites de acuerdo a su composición (PC2). La espectroscopía de REE resultó ser asimismo un método rápido y eficaz para determinar la diferente estabilidad oxidativa de los aceites estudiados. Hasta donde sabemos, este estudio conjunto de los resultados obtenidos mediante RMN y REE, ha permitido por vez primera correlacionar los datos del espectro de RMN (aldehídos totales) con los resultados de la estabilidad oxidativa medidos a través de REE. Por otro lado, el aceite de cardo ha sido analizado por primera vez mediante RMN, mostrando una composición de ácidos grasos muy similar al aceite de girasol, pero con mayor porcentaje de PUFA. El efecto de la fritura fue similar para ambos aceites pero la disminución de PUFA y el aumento de SFA, fueron menores en el aceite de cardo que en el aceite de girasol. El aceite de cardo presentó una mayor estabilidad oxidativa debido a la menor formación de compuestos secundarios que la experimentada por el aceite de girasol en las mismas condiciones de estudio. Basándose en el contenido total de aceite, el mayor perfil de ácidos grasos y su comportamiento frente a la temperatura de fritura, el cardo podría ser una potencial fuente de aceite comestible.



Trabajo 3

“Deep-fat frying monitoring by NMR and EPR of culinary oils versus cynara oil”

J. Agric. Food Chem. (Enviado)

Parte de este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en el “II European Week of Practical Nutrition - VII Congreso Internacional de nutrición, alimentación y dietética” celebrado en Madrid en mayo de 2011 y publicado en la revista *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* (Nutr. clín. diet. hosp. 2011; 31; supl. 1; 27).

Chapter III.1.3

Article

Deep-fat frying monitoring by ^1H -NMR and EPR of culinary oils versus cynara oil.

David Castejón^{1,†}, Antonio Herrera²; Ángeles Heras³; M. Isabel Cambero⁴; Inmaculada Mateos-Aparicio^{*5}

¹ CAI de RMN y RSE, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; E-Mail: dcastejon@ucm.es (D.C.)

² Dept. of Organic Chemistry, Chemistry Faculty, Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.; E-Mail: aherrera@ucm.es (A.H.)

³ Instituto de Estudios Biofuncionales. Dept. of Physical Chemistry II, Pharmacy Faculty. Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid, Spain ; E-Mail: aheras@ucm.es (A.H.)

⁴ Dept. of Nutrition, Bromatology and Food Technology, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; E-Mail: icambero@ucm.es (M.I.C.)

⁵ Dept. of Nutrition and Bromatology II, Pharmacy Faculty, Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid, Spain (I.M.A.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: inmateos@farm.ucm.es; Tel.: +34-91-394-1807; Fax: +34-91-394-1799.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The oil from cultivated cardoon (*Cynara cardunculus* L.) presents an interesting yield and a similar fatty acid profile to sunflower oil that could provide an alternative to the latter. In a comparative study of the most frequently used culinary oils (sunflower and olive) and the oil from cynara, these were submitted to deep-fat frying in a domestic fryer during 36 h and aliquots were taken at 0, 1, 6, 12, 18 and 36 h. The degradation of fatty acids and secondary formed compounds was assessed by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and oil oxidative stability was evaluated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. During the thermoxidation process, the sunflower and cynara oils suffered a decrease in polyunsaturated fatty acid (PUFA) and an increase in saturated fatty acid (SFA) and monounsaturated fatty acid (MUFA). However, the PUFA decrease in olive oil was associated with a decrease in MUFA and an increase in SFA. The formation of aldehydes and epoxides was detected from the first hour of heating. From this point, the percent aldehyde contents was much higher in Sunflower and Cynara oils than in Olive and the percent of epoxides increased more in this oil than in the others. ^1H NMR and EPR were efficient tools to monitor oil quality due to oxidative degradation without any pre-treatment. Oxidative stability measured by EPR correlates well with aldehyde formation.

Owing to a favorable behavior of the fatty acid profile with frying temperature and to new oxidation compounds formed, cynara oil could be a potential frying edible oil.

Keywords: Edible oils; cardoon; Cynara oil; deep-fat frying; NMR; EPR

1. Introduction

In recent years the use of NMR in edible oil analysis has increased as it provides more information than routine analysis for fatty acids with GC-FID.^{1,2} With NMR the whole sample spectrum can be obtained, avoiding long preparation times and costly organic solvents. Moreover, NMR does not produce changes in the nature of the sample. An additional advantage is the possibility to obtain important information about the studied oil through analysis of the minor components. In this regard, information can be obtained about adulteration, freshness or degree of oxidation.² The majority of studies carried out by ¹H-NMR in vegetable oils are focused on olive oil although there are also some on sunflower oil, corn oil and sesame oil.² However, cynara oil has never been analyzed by NMR.

Cynara cardunculus L. commonly called ‘cardoon’, is a Mediterranean species that grows naturally in arid regions with high temperature, elevated salinity and drought in summer. It has been cultivated as a vegetable since ancient times and used worldwide representing an important ingredient in the Mediterranean diet.³⁻⁵ In 2014, the land area of *Cynara cardunculus* in Spain - where it is a traditional crop - was estimated to be 549 ha.⁶ The traditional applications of cultivated cardoon include use of the blanched stalks as an edible vegetable in several dishes, such as soups and / or salads, and the flowers are also used as a rennet substitute for cheese preparation.³ The leaves are popularly known as a diuretic, choleric, cholagogue, antidiabetic, and antimicrobial agent. However, knowledge of the phenolic composition and antioxidant and antibacterial activities of this species is scarce.⁵ Cynara has also been recognized as an energy crop in Mediterranean regions. For these purposes, two kinds of products are harvested every year. The whole aerial biomass is a lignocellulosic material that can be used directly for heating or for electric power generation and the seeds, which have a high oil content (22-29%), can be used for biodiesel production.^{3,4} The oil profile in terms of major fatty acids (10.7% palmitic, 3.7% stearic, 25.0% oleic and 59.7% linoleic) is similar to that of sunflower oil,⁷ showing the potential of cardoon as an oil crop. The oil content of cardoon seeds is lower than sunflower seeds but the production costs are much higher for sunflower, since it needs to be sown annually. However, at present, cynara oil has no commercial value as edible oil.²

Deep-fat frying is one of the oldest and popular food preparations because fried foods have desirable organoleptic properties such as flavor or color. Frying consists in immersing food in hot oil at a high temperature (160 °C to 190 °C). The frying oil suffers common chemical reactions such as hydrolysis, oxidation and polymerization.⁸ Lipid oxidation is the most important cause of oil and fat deterioration, reducing shelf life and nutritional value, which can lead to rejection by consumers and losses for the target industries. During lipid oxidation, hydroperoxides are formed as primary products that are easily decomposed to secondary products such as aldehydes, ketones, alcohols and acids. Oxidative and thermolytic reactions, such as polymerization, hydrolysis, isomerization, and

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.3*, 1-18.

cyclisation, produce a major decomposition forming non-volatile polar compounds and triacylglycerol dimers and polymers.⁹

It is important to assess the oxidative degradation of fats and oils in the food industry, because free radical-initiated oxidation is one of the main causes of rancidity. Free radicals are known to be responsible for the oxidation of food components, resulting in alterations of the major quality-control parameters, such as color, flavor, aroma and nutritional value of foodstuffs.¹⁰ Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, also called electron spin resonance (ESR) spectroscopy, could detect the evolution of radical species intermediate in kinetic reactions, but the radical stability is often too low to produce a quantifiable steady-state concentration. In order to avoid this negative aspect, the spin-trapping technique was developed, in which diamagnetic molecules (spin traps) and short-lived radicals react to produce more stable, easily detectable secondary radicals (spin adducts).^{11,12} In this study, the stable galvinoxyl radical was selected to monitor the state of selected oils submitted to thermal oxidation.

The aim of the present work was to study the changes undergone by cynara oil submitted to deep-frying compared to the two most common culinary oils, olive and sunflower. To carry out this study we monitored oil quality by quantifying fatty acids, hydroperoxides, aldehydes and epoxides through ¹H-NMR spectra and we correlated this information with EPR spectroscopy data.

2. Experimental Section

2.1 Samples.

The oils used were olive oil (0.4° acidity) and refined sunflower oil (0.2° acidity), which were purchased from a local supermarket (three bottles of the same batch for each oil), and cynara oil obtained from *Cynara cardunculus* in the facilities of Agroenergetic Group (Universidad Politécnica de Madrid, Spain) according to the protocol described by Curt et al (2002).⁷

2.2 Deep-fat frying procedure.

The selected oils were submitted to a frying procedure in a domestic deep-fat fryer with an aluminium vessel. For each oil, i.e. olive oil, sunflower oil and cynara oil, the fryer was filled with 1 L of the selected oil and heated to 160 °C during 36 hours. This procedure was repeated three times for each one. Aliquots were collected at 0, 1, 6, 12, 18 and 36 hours and stored in a freezer at -80 °C before analysis. Oil composition at low temperature is constant¹³ and the preliminary EPR results do not show significant changes ($p < 0.05$) between frozen and unfrozen samples.

2.3 Monitoring of the deep-fat frying process by ¹H-NMR.

The oil sample (200 µL) was introduced directly into the 5-mm NMR tube with 400 µL of chloroform-d [99.8 at % D, containing 0.1 % (v / v), tetramethylsilane (TMS)] and 10 µL of DMSO-d₆. This mixture of solvents ensures a perfect solubility of all minor oil components; even of those not soluble in pure chloroform.¹⁴ The sample was shaken with a vortex during 1 min. The NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 MHz NMR spectrometer at 25 °C using a 5 - mm multinuclear direct detection probe. The ¹H-NMR chemical shifts were referenced to zero using the internal

reference signal (TMS). Bruker BioSpin supplied the pulse sequences and TopSpin 2.1 was the software package used for NMR data processing. Before the ^1H -NMR spectrum was acquired for each sample, the probe was automatically locked, tuned, and matched. The field homogeneity had to be optimized, and careful shimming was done. The quality of the shimming was evaluated for each sample using the signal at 4.33 ppm due to the $\alpha\text{-CH}_2$ of the glycerol moiety.¹ All spectra were acquired without spinning. NMR acquisition parameters were as follows: number of scans (NS=64), time domain (TD = 64 K), spectral width (SW = 15 ppm), relaxation delay (d1 = 3 s), acquisition time (AQ = 4.36 s), and pulse angle ($\alpha = 90^\circ$) with a total experimental time of 8 min 23 s. The ^1H -NMR spectrum was manually phased by applying zero- and first-order phase corrections, taking care to achieve good symmetry on all peaks. To obtain a quantitative comparison of the spectra, the baseline was corrected using a polynomial function. The integral data extracted from the spectrum was analyzed using standard software (Microsoft Office Excel 2007) to monitor the FAC and the formation of primary and secondary oxidation products.

2.4 Evaluation of oxidative stability of the oils.

The oxidative stability was monitored by EPR during the thermal procedure and the iodine value (IV) was determined. This was based on ^1H NMR data from a previously developed approach which showed that the iodine value is related to the percentage of olefinic protons (% OP) by the equation: $\text{IV} = 10.54 + 13.39 \% \text{ OP}$.¹⁵ The percentage of olefinic protons (% OP) in the oil can be directly determined from the area of signal J in **Figure 1**.

EPR analysis was carried out following the procedure described by Quiles et al. (2002) with some modifications.¹¹ Briefly, 800 μL of ethanol were added to 200 μL of the oil aliquot and submitted to vortex agitation for 5 minutes. The ethanolic solution was taken and the antioxidant potential was assessed from the ability of the ethanolic solution to reduce an equivalent volume of 1 mM of an ethanolic solution of galvinoxyl (2,6-di-tert-butyl-a-(3,5-di-tert-butyl 4-oxo 2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-p-tolyloxy. Galvinoxyl is a sterically protected, resonance-stabilized synthetic radical. After 5 min of vortex agitation, the amount of remaining radical was determined by double integration of the EPR spectrum and comparison with a control reaction (0.5 mM of an ethanolic solution of galvinoxyl).

EPR spectra were recorded at room temperature (22 $^\circ\text{C}$) on a Bruker EMX spectrometer working at 9.75 GHz (X - band frequency). The samples were transferred to an EPR capillary tube (cylindrical ER221 / TUB4 Bruker quartz tube with a 4 mm inner diameter). Typical operating parameters of the ESR spectrometer were as follows: microwave power 10.1 mW, modulation amplitude 0.10 G, center field 3480 G, sweep width 50 G and time constant, 1.25 ms. The signal intensity was calculated from the double integral of the EPR spectra.

2.4 Statistical Analysis.

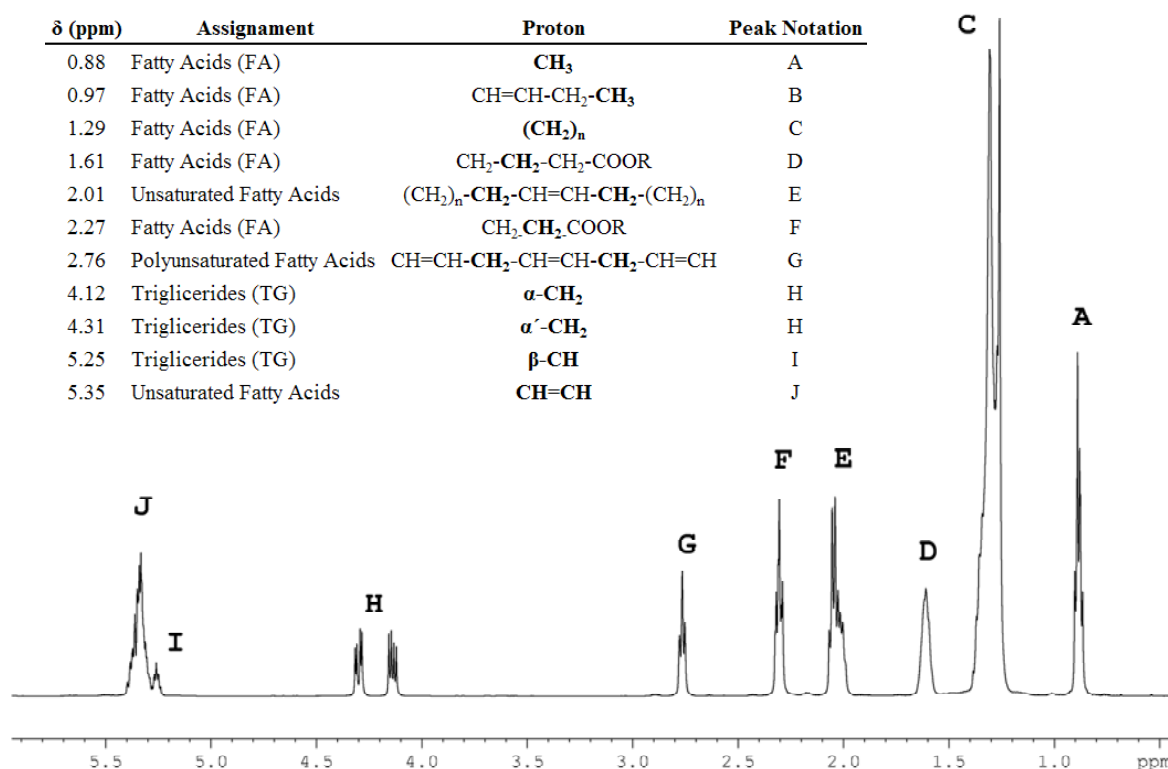
Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) performed using the Statgraphics Plus 5.1. (Warrenton, VA, USA). Multivariate statistical analysis and graphs were obtained using the Amix 3.9.11 (Bruker, Biospin). For multivariate statistical analysis of the bucket-reduced NMR spectra, a Principal Component Analysis (PCA) procedure was used.

3. Results and Discussion

3.1 Effect of the deep-fat frying procedure in FAC.

Figure 1 shows the ^1H NMR spectrum of the cynara oil (0 h). As far as we know, it is the first time that cynara oil has been analyzed by NMR spectroscopy. The spectra of un-oxidized cynara oil has nine main signals, indicated with different letters (A-J),² between 0.0 and 5.5 ppm. Each of these signals was produced by the different types of hydrogen atoms present in the oil. Their assignments are described in the table included in Figure 1.

Figure 1. ^1H NMR spectrum of the original cynara oil. The signal letter agrees with those in the table that include the assignment of the main signals of the cynara oil ^1H NMR spectrum.



As shown in previous studies, the ^1H NMR spectra of oils contain a great deal of information and their simple observation reveals whether the studied oil contains oleic acid (see signals A, C, and E), linoleic acid (see signals A and G) and linolenic acid (see signals B and G).¹⁶ Like sunflower oil, cynara oil is rich in linoleic acid and does not contain linolenic acid (signal B). The integration of these signals, carried out by applying the equations described in a previous work,² gives the fatty acid composition (FAC), generally known as nutritional labeling compositional data, i.e. the percentages of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). Table S1 shows the FAC obtained for the three oils analyzed at the different frying times. The non-fried cynara oil FA composition was 54.7 % of PUFA (linoleic acid mainly), 26.9 % of MUFA and 18.4 % of SFA. These values were similar to those obtained for non-fried sunflower oil (51.4 % PUFA, 33.0 % of MUFA and 15.8 % of SFA). Finally, the FAC of non-fried olive oil was 8.57 % of PUFA, 76.99 % of MUFA and

14.44 % of SFA. **Figure 2** shows the evolution of FAC for the three oils (olive, cynara and sunflower) at the different evaluated times (0, 1, 6, 12, 18, 36 hours). Olive oil composition after 36 h of frying treatment was 4.96 % of PUFA, 70.59 % of MUFA and 24.45 % of SFA. Cynara oil at 36 h presented a composition of 46.2 % of PUFA, 29.3 % of MUFA and 24.5 % of SFA and Sunflower oil at 36 h had a FAC of 38.5 % of PUFA, 35.2 % of MUFA and 26.3 % of SFA. During the oxidation process, cynara and sunflower oils suffered a decrease in PUFA (7.97 % and 12.93 % respectively, with respect to the initial FAC) and an increase in SFA (5.09 % and 10.28 %) and MUFA (2.86 % and 2.65 %). However, in olive oil the decrease in PUFA (3.61 %) was also associated with a reduction in MUFA (6.4 %) and with an increase in SFA (10.01 %). The results obtained were consistent with those reported in previous works that evaluated the deep frying of sunflower and olive oils.^{17,18}

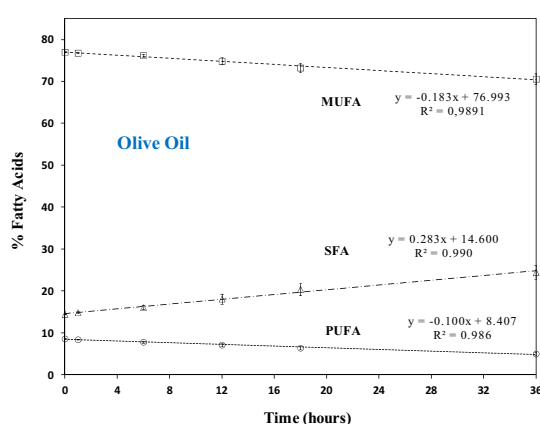
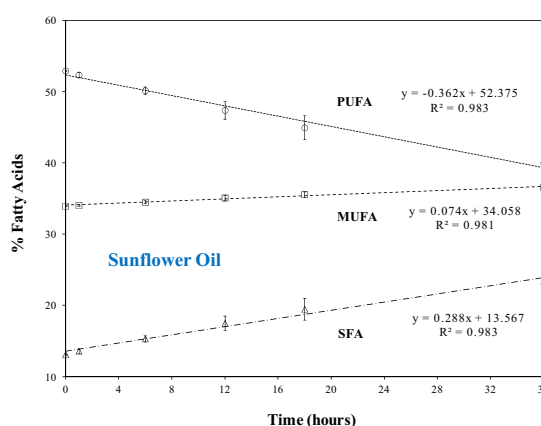
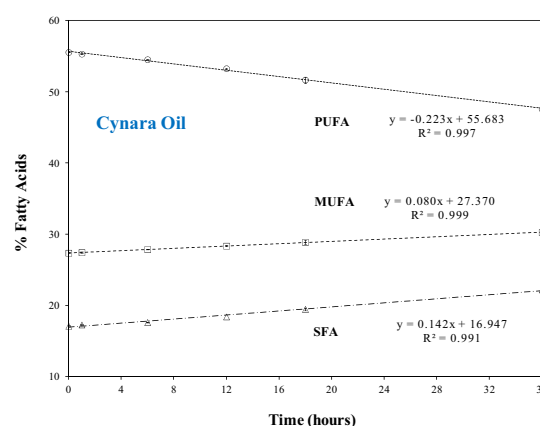


Figure 2. Evolution of fatty acids (MUFA, PUFA and SFA plus modified acyl groups) of olive, cynara, and sunflower oils at different times during the frying treatment (mean \pm standard deviation, $n = 3$ for each point).



It is well-known that during the oil thermoxidation process, linoleic acid chains may break into two parts, one of smaller molecular weight and the other one that remains bonded to the triglyceride structure.¹⁹ This structure can be modified without breaking by incorporating oxygen atoms in their structure or forming carbon-carbon bonds with other acyl group chains. These modifications result in an increase in monounsaturated or saturated chains,¹⁹ as observed in Figure 2 for cynara and sunflower oil. In the same way, monounsaturated acyl group chains can originate saturated acyl groups if carbon-carbon linkages are formed. In olive oil, the degradation rate of the oleic acid (as the main fatty acid in MUFA) was higher (a 6.4 % decrease after 36 hours of heating) than those obtained for the di- and tri-unsaturated acyl groups (a 3.61 % decrease of PUFA). This result indicates that the degradation rate at a given frying temperature is not only associated with the tendency of the acyl groups to oxidize but

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.3*, 1-18.

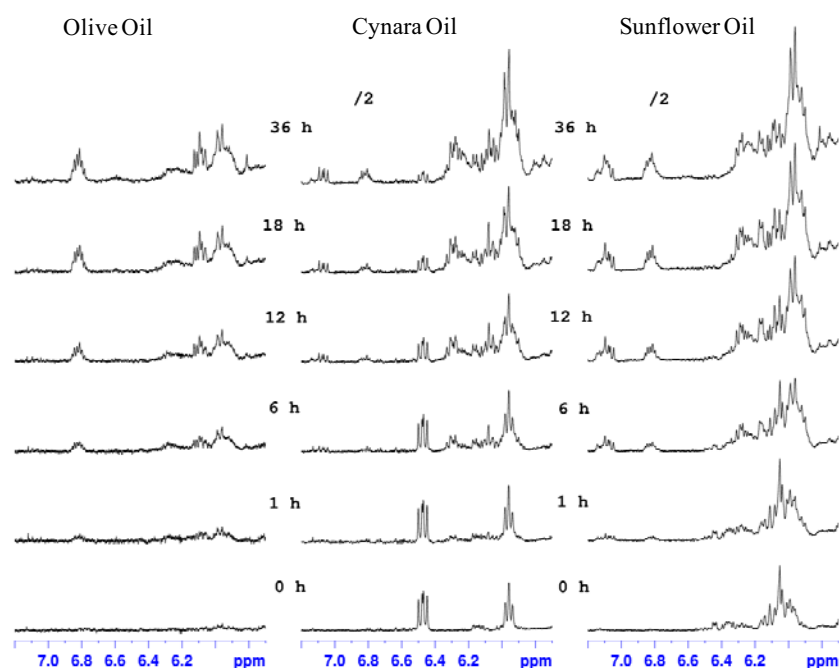
also with the concentration of acyl groups in the oil. The degradation process of each acyl group of the studied oils followed a first order kinetic.¹⁸ The higher degradation rate of oleic groups in oleic-rich oils and of linoleic groups in linoleic-rich oils has also been described previously.²⁰

The PUFA decrease in cynara oil (8.0 % after 36 h) was lower than that observed in sunflower oil (12.9 %). Moreover, the SFA increase in sunflower oil (10.3 %) was twice that in cynara oil (5.1 %). These findings show that cynara oil FAC presents a greater stability to oxidation than the sunflower oil.

3.2 Effect of the deep-fat frying procedure in primary Oxidation Compounds Formed.

It is generally accepted that one of the first changes produced in the thermoxidation processes of edible oils is the formation of hydroperoxides in acyl group structures with or without, *cis*, *trans*- or *trans*, *trans*- conjugated dienic systems. This has been observed in the extra virgin olive oil degradation processes at 70 and 100 °C with aeration, or even at room temperature in closed receptacles.^{19,21} In relation to monitoring the formation of primary oxidation compounds, it is necessary to focus attention on the spectral region between 5.6 and 7.2 ppm.¹⁹ The enlargement of this region of the ¹H NMR spectra of the three oils analyzed throughout the thermoxidative processes provides information on some of the new compounds formed (**Fig. 3**). At 0 h this region is free of signals in olive oil; however, in sunflower oil this region presented the typical olefinic proton signals²² and in cynara oil the presence of a conjugated linoleic acid (CLA) was observed. The presence of CLA in vegetable oils has been previously described by other authors.²³ The assignment of these signals (5.39, 5.65, 5.96 and 6.47) is given in **Table 1**. This assignment was confirmed by two-dimensional experiments. **Figure S1** shows the CLA cross-peak signals in the ¹H,¹H-COSY spectrum of cynara oil.

Figure 3. Evolution during the oxidative treatment. Expanded region of the ¹H NMR spectra between 5.7 and 7.2 ppm for the olive, cynara and sunflower oils submitted to frying temperature.



After analyzing the signals present in the spectra of the three studied oils and comparing them with those previously described for hydroperoxide protons (Table 1),¹⁷ we can conclude that the ¹H NMR spectra (**Figure 3**) contain neither protons of hydroperoxy groups nor protons of conjugated diene systems bonded to hydroperoxy or hydroxy derivatives. This indicates that the functional groups formed during oil thermoxidation at 160 °C in a domestic fryer were degraded at very high rates and did not accumulate¹⁷ to be detected by ¹H NMR. These results are well correlated with those described by Guillen et al. (2009, 2012) in olive and sunflower oil heated at 190 °C.^{17,18} The signals that appeared on expansion of **Figure 3** corresponded to the protons of conjugated dienic systems of aldehydes and other secondary oxidation products (**Table 1**) that increased with heating time. Thus, although intermediate degradation compounds (hydroperoxides) were not found in the oils studied, the formation of aldehydes was detected in the three studied oils at the first hour of heating. These compounds will be discussed later.

Table 1. Chemical shift assignment of the ¹H NMR spectra signals for the main compounds described during the manuscript discussion.

δ (ppm)	Assignment	Proton (Multiplicity) ^a	Additional Information
1.33	n-alkanals	CH ₂ CH ₂ CH ₂ -COH	Saturated Aldehydes - TOCSY (9.75)
1.48	Epoxy	CH ₂ -CHOCH	COSY (2.88)
1.50	Epoxy	CH ₂ -CHOCH-	COSY (2.66)
1.63	n-alkanals	CH ₂ CH ₂ -COH	Saturated Aldehydes - TOCSY (9.75)
2.19	(E,E)-2,4-alkadienals	CH ₂ -CH=CH-CH=CH-CHO	Unsaturated Aldehydes - COSY (6.07)
2.33	(E)-2-alkanals	CH ₂ -CH=CH-COH	COSY(6.81) TOCSY(6.10;9.49)
2.40	n-alkanals	CH ₂ -COH	Saturated Aldehydes - COSY (9.75)
2.66	Epoxy	CH ₂ -CHOCH-CH ₂	COSY(1.50)
2.88	Epoxy	CH ₂ -CHOCH-CH ₂	Epoxy oleic acid - COSY (1.48)
2.89	Epoxy	CHOCH-CH ₂ -CH=CH-	Epoxy linoleic and linolenic acid - COSY(1.52)
3.06	Epoxy	CHOCH-CH ₂ -CHOCH	Diepoxides
5.39	Conjugated Linolenic Acid (CLA)	CH=CH-CH=CH	Cynara Oil - COSY(5.96) TOCSY(6.47)
5.47	Hydroperoxy-(E,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH (ddm)	(E,E) conjugated double bond groups
5.51	Hydroperoxy-(Z,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH (dtm)	(Z,E) conjugated double bond groups
5.56	Hydroperoxy-(Z,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH (ddm)	(Z,E) conjugated double bond groups
5.65	Conjugated Linolenic Acid (CLA)	CH=CH-CH=CH	Cynara Oil - COSY(6.47) TOCSY(5.39;5.96)
5.76	Hydroperoxy-(E,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH (dtm)	(E,E) conjugated double bond groups
5.96	Conjugated Linolenic Acid (CLA)	CH=CH-CH=CH	Cynara Oil - COSY(5.39;6.47) TOCSY(5.96)
6.00	Hydroperoxy-(Z,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH (ddtd)	(Z,E) conjugated double bond groups
6.06	Hydroperoxy-(E,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH (ddtd)	(E,E) conjugated double bond groups
6.07	(E,E)-2,4-alkadienals	CH=CH-CHO-	COSY (2.19;7.07)
6.10	(E)-2-alkanals	CH=CH-COH	COSY(6.81;9.49) TOCSY(2.33)
6.27	Hydroperoxy-(E,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH	(E,E) conjugated double bond groups
6.31	(E,E)-2,4-alkadienals	CH=CH-CH=CH-CHO	Unsaturated Aldehydes - COSY(7.08) TOCSY(9.52)
6.47	Conjugated Linolenic Acid (CLA)	CH=CH-CH=CH	Cynara Oil - COSY(5.65; 5.96) TOCSY(6.47)
6.58	Hydroperoxy-(Z,E)- conjugated-dienic systems	CH=CH-CH=CH (dddd)	(Z,E) conjugated double bond groups
6.82	(E)-2-alkanals	CH=CH-COH	Unsaturated Aldehydes - COSY(2.33;6.10) TOCSY(9.49)
7.08	(E,E)-2,4-alkadienals	CH=CH-CHO-	Unsaturated Aldehydes - COSY(6.06;6.31) TOCSY(9.52)
9.49	(E)-2-alkanals	CHO- (d)	Unsaturated Aldehydes - COSY(6.10) TOCSY(2.33;6.81)
9.52	(E,E)-2,4-alkadienals	CHO- (d)	Unsaturated Aldehydes - COSY(6.06) TOCSY(6.31;7.08)
9.57	4-hydroxy-(E)-2-alkanals	CHO- (d)	Unsaturated Aldehydes - COSY(6.38)
9.60	(Z,E)-2,4-alkadienals	CHO- (d)	Unsaturated Aldehydes - COSY(6.12)
9.75	n-alkanals	CHO- (t)	Saturated Aldehydes - COSY(2.40) TOCSY(1.33;1.63)
9.78	4-oxoalkanals	CHO- (t)	Saturated Aldehydes

^a Abbreviations: d, doublet; t, Triplet; m, multiplet.

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.3*, 1-18.

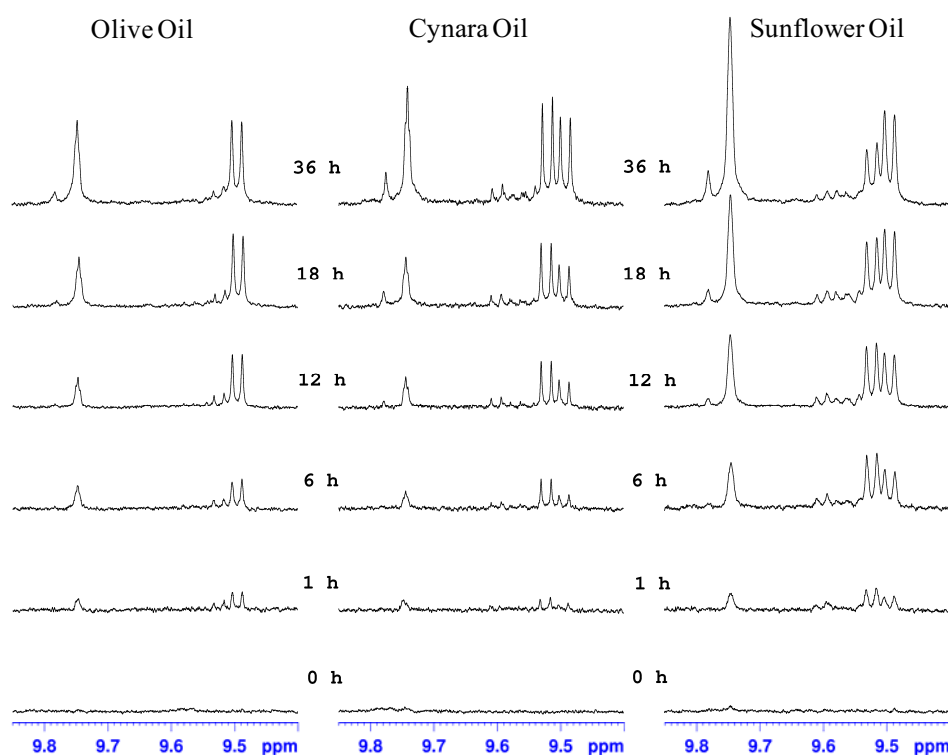
Although the metabolic profiles from cynara and sunflower oils shown in **Figure 3** were very different before the thermal oxidative process, after 6 h of frying, these oils showed a very similar metabolic profile. CLA degradation during heating of cynara oil can also be observed in **Figure 3**. This can be attributed to the low stability of CLA against oxidative processes.²²

3.3 Effect of the deep-fat frying procedure on the Secondary Oxidation Compounds Formed of the deep-fat frying procedure in FAC.

During the oxidative treatment the presence of secondary degradation products, such as aldehydic compounds, which increase with the frying time. Enlargement of the spectral region between 9.4 and 9.8, in which the signal of the aldehydic protons appears, is shown in **Fig. 4**. Assignment of the signals to the different kinds of aldehydes is reported in Table 1, in which the chemical shifts of all protons of these compounds and the cross-peak in the homonuclear 2D NMR experiments are also indicated (**Figure S1**).

The studied oils contained the following unsaturated aldehydes: (E)-2-alkanals (signal of the aldehydic proton centered at 9.49, and at 6.10 and at 6.81 ppm from their dienic conjugated protons); (E,E)-2,4-alkadienals (signal of the aldehydic proton centered at 9.52, and at 6.06, 6.31 and 7.08 from their dienic conjugated protons); 4-hydroxy-(E)-2-alkenals (signal of the aldehydic proton centered at 9.57); (Z,E)-2,4-alkadienals (signal of the aldehydic proton centered at 9.60), and, finally the saturated aldehydes: alkanals and 4-oxo-alkanals (whose aldehyde protons appear at 9.75 and 9.78 ppm, respectively) (see **Figure S2**).

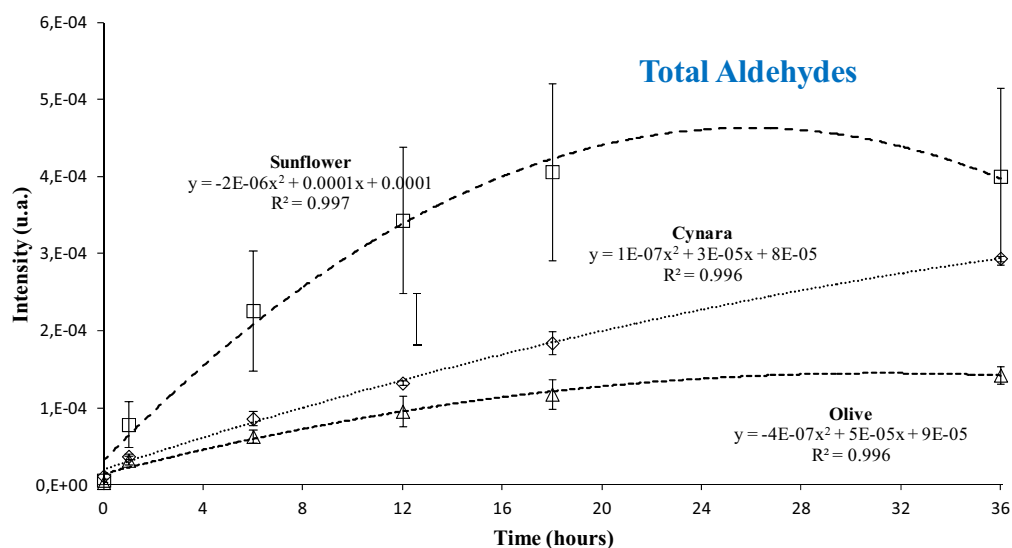
Figure 4. ¹H NMR expanded region between 9.40 and 9.85 ppm that shows the evolution of aldehydes during oxidative treatment.



As mentioned above, most of the aldehydic signals increased during oil thermoxidation. Large differences were found between the aldehydic compounds present in sunflower and cynara oils and those observed in olive oil (**Figure 4**). While the main unsaturated aldehyde in olive oil was (E)-2-alkenals, in cynara and sunflower oils these corresponded to (E)-2-alkenals and (E, E) -2,4-alkadienals. In addition, the genotoxic and cytotoxic aldehydes, 4-hydroxy-(E)-2-alkenals and (Z,E)-2,4-alkadienals²³ were present in cynara and sunflower oils, but were not detected in the olive oil spectra. Thus, the kind of aldehydes formed during the oxidation process seems to depend on the initial composition of the oil studied. Moreover, the formation of different aldehydes in sunflower oil varied from early on, when (E, E) -2,4-alkadienal content was greater than (E)-2-alkenals, until the end of the experiment, when this relationship was reversed (**Figure 4**).

Figure 5 shows the evolution of total aldehydes in the three oils analyzed during the frying process (each integral was normalized versus total spectral integral). This figure also shows the equations that described the total aldehydic variation against heating time. As can be observed, the correlation coefficients were very high in all cases ($R^2 = 0.99$). As shown in the figure, the largest increase in total aldehydes occurred in the early hours of heating (0 - 18 hours), which almost fits a linear model. However, at the longest heating times, evolution of the concentration of these aldehydes was almost flat. This behavior is very clear in sunflower and in olive oils, but in cynara oil the aldehyde concentration remained linear.

Figure 5. Experimental values (mean \pm standard deviation, $n=3$ for each point) of intensity (u.a.) in the olive, cynara and sunflower oil for the total aldehydes vs heating time (best fitting curves and the equations that relate the intensity of the total aldehydes with heating time together with their correlation coefficients are represented).



Other secondary oxidation products are epoxides. These compounds could be derived from oleic and linoleic acyl groups during the oxidation process.⁶ **Figure 6** presents the ^1H NMR expanded region between 3.15 and 2.47 ppm that shows the evolution of epoxy and other secondary degradation products during the oxidative treatment. It is important to note that the monitoring of epoxides should provide a more comprehensive understanding of lipid oxidation mechanisms as recently, epoxides

D. Castejón et. al. **2015**, *III.1.3*, 1-18.

have been considered as important intermediates, which may be formed from peroxy radicals directly, independently of hydroperoxides.²⁴ In contrast, the decomposition of hydroperoxides generates the formation of secondary lipid oxidation products including aldehydes. **Table 1** includes the chemical shifts associated with epoxide signals. The olive oil spectra showed two signals, at 2.66 and 2.88 ppm, that clearly increase with the oxidation process (**Figure 6**). At these chemical shifts, the ¹³C satellites of the G signal appear in sunflower and cynara oils.⁷ The G signal corresponded to a methylene group between two double bonds (**Figure 1**). Thus, this signal and its ¹³C satellites will be greater in oils with a high level of PUFA, such as cynara and sunflower, and less in oils with a FA composition based on SFA and / or MUFA. This hinders the epoxy integration in sunflower and cynara oil. Therefore, to give a real value, the zero time was integrated in the three oils and the integral value obtained was subtracted from the rest. The epoxy values were obtained using the method described by Wei et al. (2015).²⁵ According to this method, signals of the *sn-1* and *sn-3* glycerol protons (4.18 - 4.33 ppm) were taken as an internal standard for quantification because they were well separated from other signals and remained constant during oxidation. For new signs related to the generation of epoxides (**Table 1**), the epoxy protons between 2.90 - 3.10 ppm were selected as the best indicators of epoxide formation.²⁵ **Figure 7** shows epoxy intensity evolution versus heating time. The epoxy concentration increased with heating time showing a high linear correlation coefficient ($R^2 = 0.976$ and line slope = 0.0038; $R^2 = 0.955$ and line slope = 0.0015 and $R^2 = 0.951$ and line slope = 0.003 for olive, cynara and sunflower oil, respectively). In contrast to the results obtained for total aldehydes, the epoxides increased linearly with frying time and epoxide production did not slow down during the 36 hours analyzed.

Figure 6. ¹H NMR expanded region (3.15 - 2.47 ppm) that shows the evolution of epoxy and other secondary degradation products during the oxidative treatment.

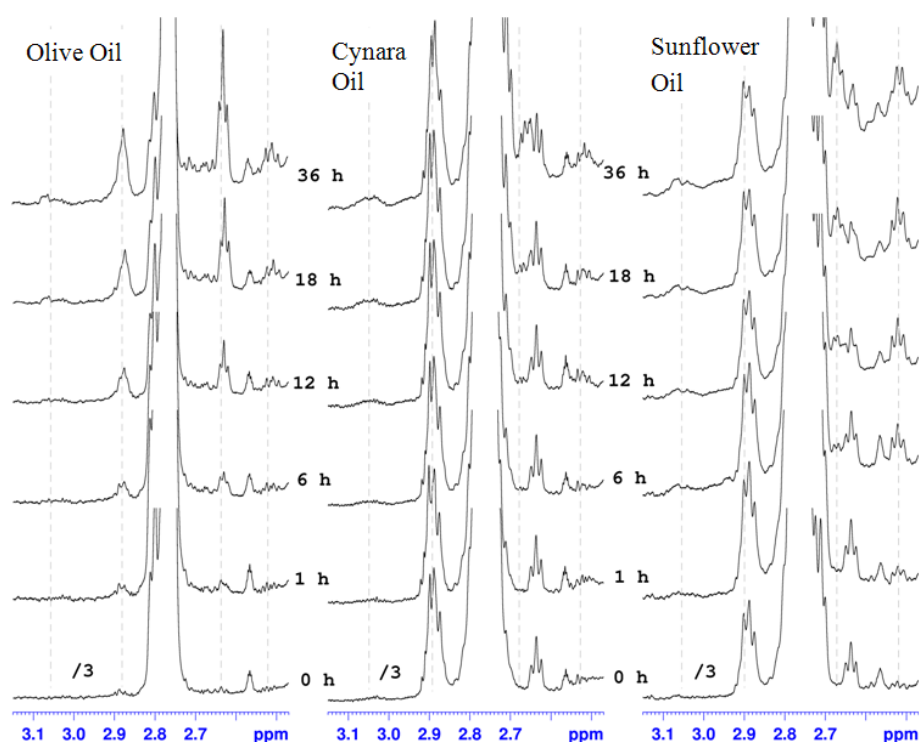
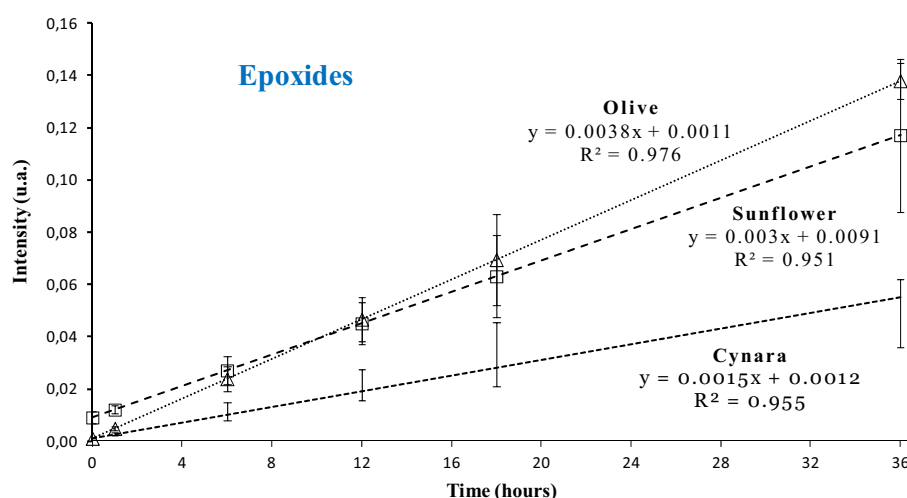


Figure 7. Experimental values of intensity (u.a.) in the olive, cynara and sunflower oils of the total epoxide vs heating time.



3.4 Monitoring thermal oxidative oil degradation by PCA analysis.

The whole data set of 65 bucket-reduced ^1H NMR spectra (columns) for 54 oil samples (rows: three samples of each oil at each of the six times (0, 1, 6, 12, 18, 36 hours)) was analyzed by PCA. **Figure 8** shows the scatter plot of PC1 vs PC2. A clear discrimination between samples of different composition and oxidative degree was revealed. In particular, the PC1 axis allowed the spectra to be separated according to the oxidation time, while PC2 classified the oils depending on their composition. Moreover, this preliminary multivariate analysis of the ^1H NMR spectra of the oils submitted to frying suggests that the total spectra contain information which could help the classification and could be used to predict the degree of oxidation of the oil analyzed.

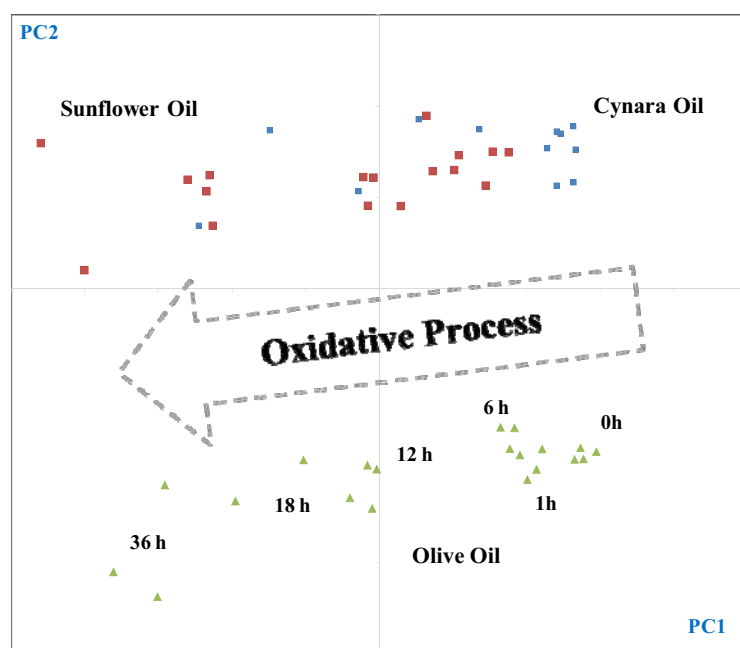


Figure 8. Scatterplot of the first two PC for the whole oil dataset. PC1 and the PC2 explain 52.62 % and 22.61 % (together 75.23 %) of the total variance, respectively.

D. Castejón et. al. **2015**, III.1.3, 1-18.

3.5 Oxidative stability against deep-fat frying procedure. Iodine value and EPR spectra.

The oxidative stability of oils could be defined as their resistance to oxidation. Some of the main indicators commonly used as markers of oil oxidation are the peroxide value and the conjugated dienic value.²⁸ These markers are not useful or adequate to monitor changes in the edible oils treated at high temperatures. This is because hydroperoxides and conjugated dienic compounds are degraded very quickly, and are present at undetectable levels.¹⁸ Another indicator used to determine the stability of oils to oxidation is the iodine value (IV).²⁹ In a previous study, a very close relationship was found between IV, determined by conventional methods, and the percentage of olefinic protons (OP), determined from its area in the ¹H NMR spectra.³⁰ In fact, these parameters were related in oils submitted to high temperatures by the equation: $IV = 10.54 + 13.39 \text{ OP}$, where OP is the olefinic proton integral values.¹⁵ The percentage of olefinic protons in the oil is determined from the area of signal J (Figure 1) and the area of total protons in each spectrum. Using the cited equation, the iodine values of olive, cynara and sunflower oils were determined. These values were represented versus heating time in Figure 9. The IV for the un-oxidized oils was: 85.98 for olive, 119.23 for sunflower and 119.22 for cynara that are significantly higher ($p < 0.05$) than those at 36 h (olive: 76.61; sunflower: 103.54; cynara: 110.46). It can be observed that the evolution of the iodine values during heating times in the three oils analyzed was similar, basically, showing a negative linear relationship with a high R^2 value ($R^2 = 0.99$). The rate of change of IV was evaluated using the slope of the fitted lines. The highest rate was obtained in the sunflower oil (-0.438), while cynara and olive oils had a similar value (0.252 and -0.271 respectively). These changes in IV are similar to those described in previous works.^{17,18}

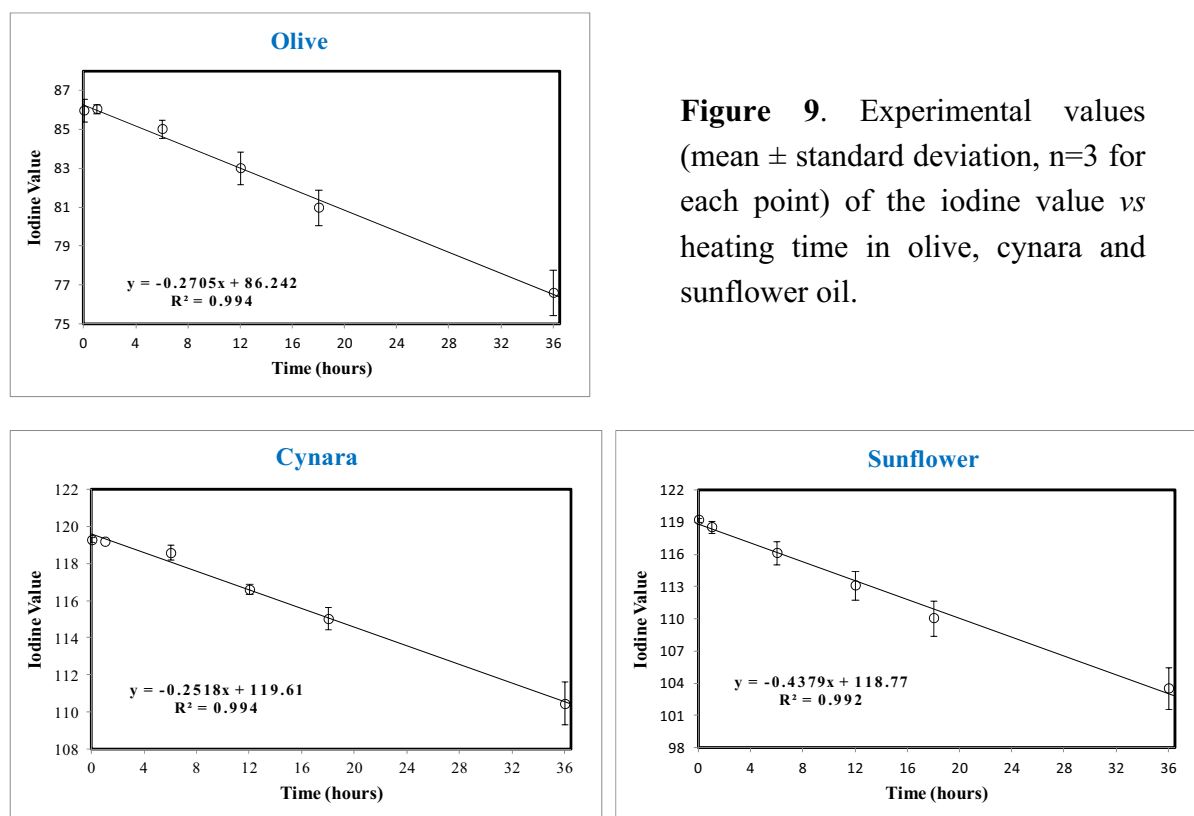
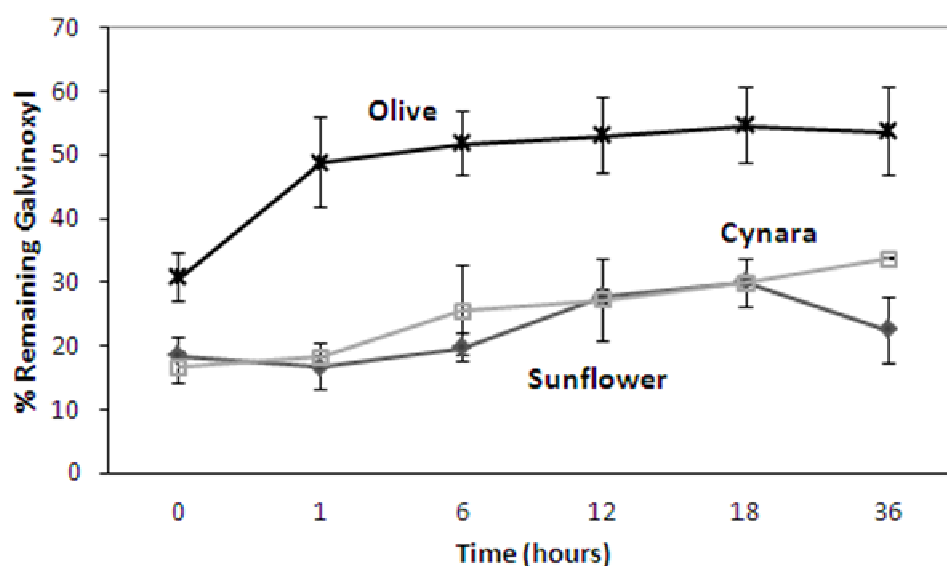


Figure 9. Experimental values (mean \pm standard deviation, $n=3$ for each point) of the iodine value vs heating time in olive, cynara and sunflower oil.

The total antioxidant capacity of the studied oils was also evaluated by EPR spectroscopy. **Figure 10** shows the oxidative stability studied through the remaining stable galvinoxyl radical after interaction with fried oils at different heating times. At the beginning of the experiment (0 h), the remaining galvinoxyl was higher ($p < 0.05$) for the olive oil. This means that the sunflower and cynara oils presented the largest amounts of antioxidants that could combine with the galvinoxyl radical and, therefore, these oils had the highest antioxidant potential ($\% \text{ Antioxidant potential} = 1 / \% \text{ Remaining Galvinoxyl}$).¹¹ oils These results could be related to the addition of labeled vitamin E (50 mg tocopherol / 100 g) to selected commercial sunflower oil and in the case of cynara oil, this behavior could be explained by it being an unrefined oil, that had its entire antioxidant content. However, the olive oil (a commercial mixture of virgin and refined olive oils)³¹ presented some antioxidants that could combine with galvinoxyl although in smaller amounts than the other oils studied.

Figure 10. Effect on galvinoxyl radical as a function of the oxidative stability, monitored by EPR, in olive, cynara and sunflower oils.



The olive oil lost most of its antioxidant capacity during the first hour of frying ($p < 0.05$) and after this time it remained invariant. In the case of sunflower and cynara oils, the increase ($p < 0.05$) in the percentage of remaining galvinoxyl was observed in the 6 hour aliquot and, therefore, these oils could maintain their antioxidant capacity until this point. After this time, the secondary oxidation products (aldehydes and epoxides) are found in very large amounts (Fig. 4 and 5) due to a greater degradation of fatty acids (Figure 2). This indicates the continuing formation of unstable free radicals that probably combine with each other forming aldehydes or epoxides instead of combining with galvinoxyl. Probably, the antioxidants have almost disappeared and the remaining galvinoxyl (non-combined) can, therefore, increase. This reduction in antioxidant capacity means that the percentage of galvinoxyl at 36 hours in the case of Cynara oil increased to $\approx 30\%$, this value was still lower than that of the olive oil (remaining galvinoxyl $\approx 50\%$). Interestingly, the sunflower oil, after 18 hours of heating showed a decrease in the remaining galvinoxyl from 30 to 20%, as well as a reduction in the percentage of total aldehydes (Figure 4). This suggests a degradation of aldehydes to form new compounds possibly

D. Castejón et. al. 2015, III.1.3, 1-18.

dimers and polymers, because this oil had a highly degraded appearance as it was viscous and orange colored. In this process, the new free radicals released possibly combined with galvinoxyl, decreasing the % remaining galvinoxyl.

Generally, it is assumed that the susceptibility of edible oils to oxidation depends on the high level of PUFA and the low concentrations of antioxidant.

Our results suggest that the oxidative stability measured by EPR appears to correlate with measures of % total aldehydes obtained by ^1H NMR. It was found significant ($p < 0.005$) linear correlation for cynara ($R^2 = 0.92$) and for sunflower ($R^2 = 0.84$; $p < 0.05$) oils. The linearity was just kept until 18 h for sunflower oil. That could be logical because from this point, the oil alteration is very high and different compounds might influence in the stability in major degree than before. For olive oil, significant ($p < 0.0005$) exponential correlation coefficient was found ($R^2 = 0.97$). On the contrary, no correlation between the values of IV and oxidative stability by EPR was observed. IV values, however, correlated well with changes in the FAC observed for the three oils. No direct correlation was observed between the values of the epoxides obtained from the NMR spectrum and the other indicators studied in this work.

4. Conclusions

^1H NMR has been found to be a rapid and effective technique to monitor the changes associated with the deep-frying process by analyzing the FAC and studying the oxidative degradation compounds. The preliminary PCA analysis of the NMR dataset of fried oils allowed the thermoxidative process vs time (PC1) to be monitored and the oils to be distinguished according to their composition (PC2). EPR spectroscopy was also a rapid and effective method to determine the different oxidative stability of the oils. As far as we know, the joint study of the results obtained by NMR and EPR allowed, for the first time, to correlate the total amount of aldehydes analyzed by ^1H NMR with the results of the oxidative stability measured by EPR.

On the other hand, the revalued cynara oil was analyzed for the first time by NMR. This showed a very similar FAC to sunflower oil but with a higher percentage of PUFA. The effect of deep-frying was similar for both oils but the decrease in PUFA and the increase in SFA were less in cynara than in sunflower oil. Cynara oil presented greater oxidative stability due to less formation of secondary compounds than in Sunflower oil. Based on the total oil content, the major fatty acid profile and its behavior with frying temperature, cynara oil could be a potential frying edible oil.

Supplementary Materials

Supplemental Material may be found in the online version of this article.

Acknowledgments

Projects AGL2010-19158 and CTQ2010-14936 (Spanish Ministry of Science and Innovation, MICINN) and S2009/ENE-1660 (Comunidad de Madrid, CAM and Fondo Social Europeo) are kindly

acknowledged for financial support. We gratefully acknowledge the CAI de RMN y RSE (Universidad Complutense de Madrid) for the cooperative collaboration.

Author Contributions

Inmaculada Mateos-Aparicio and David Castejón conceived and designed the experiments; Inmaculada Mateos-Aparicio and David Castejón analyzed the data; Antonio Herrera, Ángeles Heras and M. Isabel Cambero contributed reagents/materials/analysis tools; David Castejón, Antonio Herrera, Ángeles Heras, M. Isabel Cambero and Inmaculada Mateos-Aparicio wrote the paper; all authors contributed critical revision of the manuscript and approved the final.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Mannina, L.; D'Imperio, M.; Capitani, D.; Rezzi, S.; Guillou, C.; Mavromoustakos, T.; Vilchez, M.D.; Fernandez, A.H.; Thomas, F.; Aparicio, R. ^1H NMR-based protocol for the detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11550-11556.
2. Castejón, D.; Mateos-Aparicio, I.; Molero, M.D.; Cambero, M.I.; Herrera, A. Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by ^1H -NMR. *Food Analytical Methods* **2014**, *7*, 1285-1297.
3. Fernández, J.; Curt, M.D.; Aguado, P.L. Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products* **2006**, *24*, 222-229.
4. Gominho, J.; Lourenço, A.; Palma, P.; Lourenço, M.; Curt, M.; Fernández, J.; Pereira, H. Large scale cultivation of *Cynara cardunculus* L. for biomass production - a case study. *Industrial Crops and Products* **2011**, *33*, 1-6.
5. Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Karray-Bouraoui, N.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* **2008**, *331*, 372-379.
6. http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2013/AE_2013_13_06_13_01.pdf
7. Curt, M.D.; Sánchez, G.; Fernández, J. The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass Bioenergy* **2002**, *23*, 33-46.
8. Ferreira-Vera, C.; Priego-Capote, F.; Mata-Granados, J.M.; de Castro, María D Luque Short-term comparative study of the influence of fried edible oils intake on the metabolism of essential fatty acids in obese individuals. *Food Chem.* **2013**, *136*, 576-584.
9. Choe, E.; Min, D.B. Chemistry of deep-fat frying oils. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, R77-86.
10. Donnelly, J.K.; Robinson, D.S. Invited review free radicals in foods. *Free Radic. Res.* **1995**, *22*, 147-176.

D. Castejón et. al. **2015**, III.1.3, 1-18.

11. Quiles, J.L.; Ramírez-Tortosa, M.C.; Gómez, J.A.; Huertas, J.R.; Mataix, J. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chem.* **2002**, 76, 461-468.
12. Silvagni, A.; Franco, L.; Bagno, A.; Rastrelli, F. Thermoinduced Lipid Oxidation of a Culinary Oil: A Kinetic Study of the Oxidation Products by Magnetic Resonance Spectroscopies. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, 114, 10059-10065.
13. Alonso-Salces, R.M.; Holland, M.V.; Guillou, C. ¹H-NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil. *Food Control* **2011**, 22, 2041-2046.
14. Sacchi, R.; Patumi, M.; Fontanazza, G.; Barone, P.; Fiordiponti, P.; Mannina, L.; Rossi, E.; Segre, A. A high-field ¹H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, 73, 747-758.
15. Guillén, M.D.; Ruiz, A. Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, 105, 688-696.
16. Parker, T.; Limer, E.; Watson, A.; Defernez, M.; Williamson, D.; Kemsley, E.K. 60MHz ¹H NMR spectroscopy for the analysis of edible oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, 57, 147-158.
17. Guillén, M.D.; Uriarte, P.S. Contribution to further understanding of the evolution of sunflower oil submitted to frying temperature in a domestic fryer: study by ¹H nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 7790-7799.
18. Guillén, M.; Uriarte, P. Study by ¹H NMR spectroscopy of the evolution of extra virgin olive oil composition submitted to frying temperature in an industrial fryer for a prolonged period of time. *Food Chem.* **2012**, 134, 162-172.
19. Goicoechea, E.; Guillén, M.D. Analysis of hydroperoxides, aldehydes and epoxides by ¹H nuclear magnetic resonance in sunflower oil oxidized at 70 and 100 degrees C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 6234-6245.
20. Dobarganes, M.; Pérez-Camino, M. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. *Rev. Franc. Corps Gras (France)* **1988**, 35, 67-70.
21. Guillén, M.D.; Goicoechea, E. Oxidation of corn oil at room temperature: Primary and secondary oxidation products and determination of their concentration in the oil liquid matrix from ¹H nuclear magnetic resonance data. *Food Chem.* **2009**, 116, 183-192.
22. Guillén, M.D.; Ruiz, A. Formation of hydroperoxy- and hydroxyalkenals during thermal oxidative degradation of sesame oil monitored by proton NMR. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2004**, 106, 680-687.
23. Zeng, Z.; Lin, J.; Gong, D. Identification of Lactic Acid Bacterial Strains with High Conjugated Linoleic Acid-Producing Ability from Natural Sauerkraut Fermentations. *J. Food Sci.* **2009**, 74, 154-158.
24. Yang, L.; Leung, L.K.; Huang, Y.; Chen, Z. Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3072-3076.
25. Martínez-Yusta, A.; Guillén, M.D. A study by ¹H nuclear magnetic resonance of the influence on the frying medium composition of some soybean oil-food combinations in deep-frying. *Food Res. Int.* **2014**, 55, 347-355.

26. Schaich, K.M. Thinking outside the classical chain reaction box of lipid oxidation. *Lipid Technology* **2012**, 24, 55-58.
27. Xia, W.; Budge, S.M.; Lumsden, M.D. A new ^1H NMR-based technique to determine epoxide concentrations in oxidized oil. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 5780-5786.
28. Marmesat, S.; Morales, A.; Velasco, J.; Ruiz Méndez, M.; Dobarganes, M.C. Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y Aceites* **2009**, 60, 155-160.
29. Asuquo, J.; Anusiem, A.; Etim, E. Extraction and characterization of rubber seed oil. *International Journal of Modern Chemistry* **2012**, 1, 109-115.
30. Miyake, Y.; Yokomizo, K.; Matsuzaki, N. Rapid determination of iodine value by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, 75, 15-19.
31. Fragaki, G.; Spyros, A.; Siragakis, G.; Salivaras, E.; Dais, P. Detection of extra virgin olive oil adulteration with lampante olive oil and refined olive oil using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate statistical analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2810-2816.

SUPPLEMENTARY DATA

(4 pages)

Manuscript entitled: Deep-fat frying monitoring by ^1H -NMR and EPR of culinary oils versus cynara oil.

David Castejón, Antonio Herrera, Ángeles Heras, Isabel cambero, Inmaculada Mateos- Aparicio

Table of contents

1) Table S1. Fatty Acid Composition	p 2.
2) Fig. S1. ^1H , ^1H COSY spectrum from cynara oil	p.3.
3) Fig. S2. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from aliphatic-A region (0.8-2.8 ppm)	p.4.

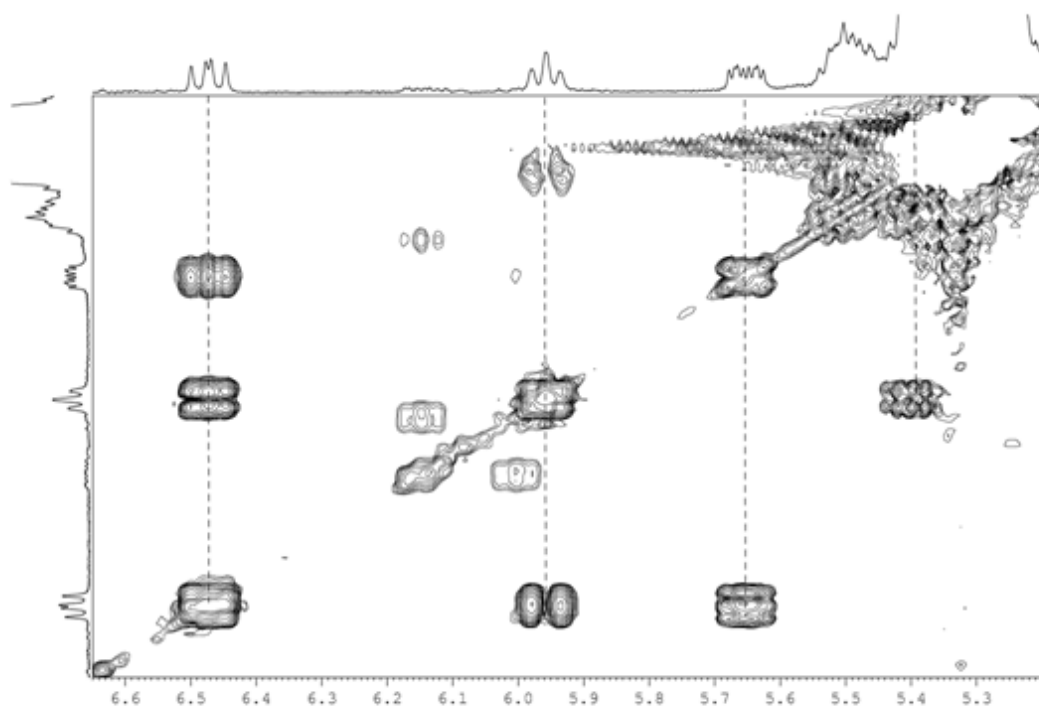
1) Table S1 – Fatty Acid Composition.

The table includes the PUFA, MUFA and SFA values and standard deviations obtained from 6 times deep-frying fat procedure evaluated (0, 1, 6, 12, 18 and 36 hours) in the three oils analyzed (olive, cynara and sunflower).

		0 h	1 h	6 h	12 h	18 h	36 h
Olive	PUFA	8.57 ± 0.04	8.37 ± 0.05	7.78 ± 0.21	7.09 ± 0.35	6.36 ± 0.41	4.96 ± 0.35
	MUFA	76.99 ± 0.11	76.79 ± 0.19	76.19 ± 0.33	74.83 ± 0.83	73.24 ± 1.16	70.59 ± 1.27
	SFA	14.44 ± 0.09	14.85 ± 0.21	16.03 ± 0.53	18.09 ± 1.18	20.40 ± 1.48	24.45 ± 1.62
Cynara	PUFA	55.54 ± 0.05	55.30 ± 0.04	54.52 ± 0.05	53.25 ± 0.09	51.66 ± 0.45	47.57 ± 0.91
	MUFA	27.37 ± 0.05	27.42 ± 0.09	27.86 ± 0.03	28.35 ± 0.08	28.88 ± 0.26	30.23 ± 0.38
	SFA	17.11 ± 0.10	17.27 ± 0.12	17.62 ± 0.05	18.40 ± 0.01	19.46 ± 0.19	22.20 ± 0.53
Sunflower	PUFA	52.94 ± 0.04	52.37 ± 0.38	50.16 ± 1.09	47.40 ± 2.43	44.95 ± 3.55	40.01 ± 5.36
	MUFA	33.94 ± 0.04	34.04 ± 0.09	34.52 ± 0.19	35.10 ± 0.40	35.57 ± 0.39	36.59 ± 0.44
	SFA	13.12 ± 0.06	13.59 ± 0.29	15.32 ± 0.92	17.50 ± 2.08	19.48 ± 3.27	23.40 ± 5.24

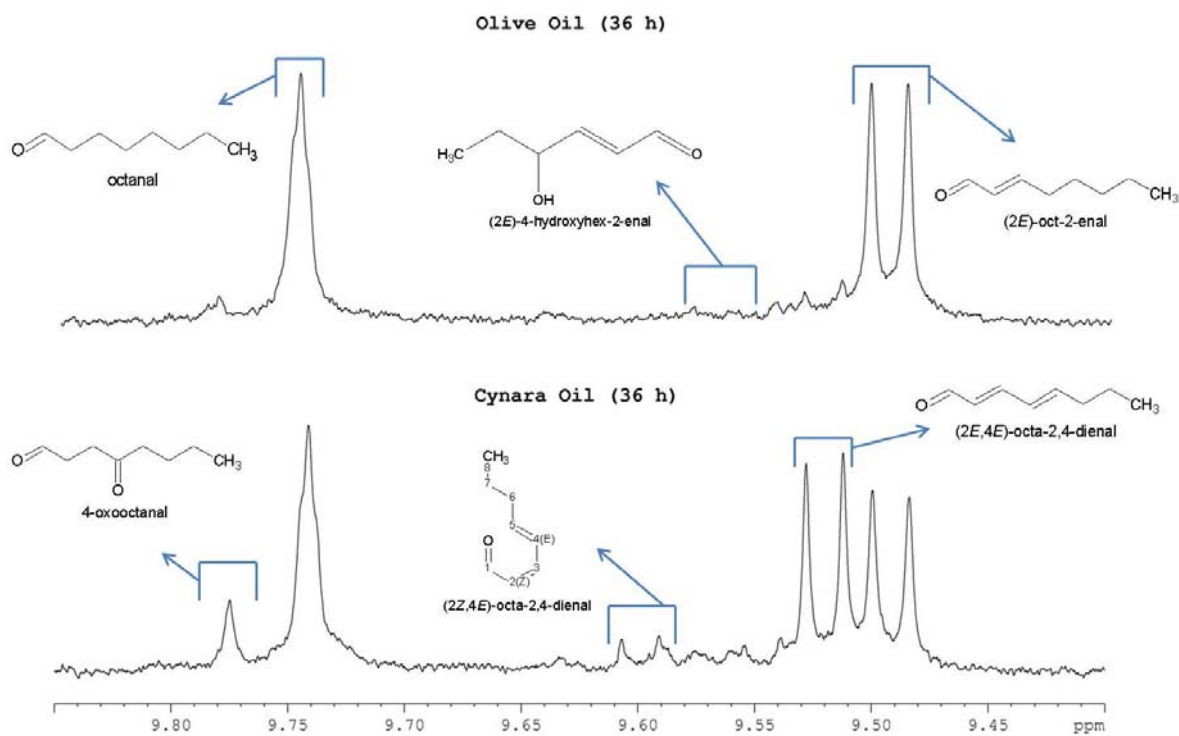
2) Fig. S1. ^1H , ^1H COSY spectrum of cynara oil.

Fig. S1 Expanded region of ^1H - ^1H COSY spectrum of cynara oil that shows the correlations between the CLA system (5.39; 5.65; 5.96 and 6.47 ppm).



3) Fig. S2. ^1H -NMR spectra of olive and cynara oils.

Fig S2 shows the expanded region (9.85 to 9.40 ppm) of ^1H -NMR spectra of olive and cynara oils and the corresponding aldehyde protons.



III.2. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE RMN AL ESTUDIO DEL EFECTO DEL ALMACENAMIENTO Y DEL TRATAMIENTO CON RADIACIONES IONIZANTES (HACES DE ELECTRONES ACELERADOS) EN MIOSISTEMAS.



III.2.1. APLICACIÓN EN MUESTRAS DE PESCADO.



III.2.1.1: CARACTERIZACIÓN DEL MÚSCULO DE SALMÓN AHUMADO Y MONITORIZACIÓN DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN MEDIANTE HRMAS.

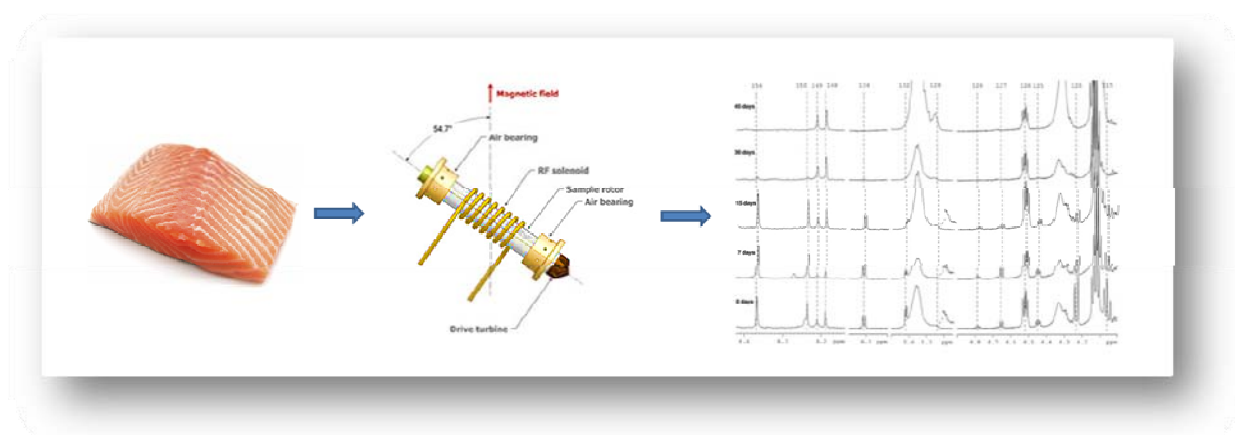
III.2.1.1: CARACTERIZACIÓN DEL MÚSCULO DE SALMÓN AHUMADO Y MONITORIZACIÓN DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN MEDIANTE HRMAS.

En el mercado actual de alimentos, sujeto a legislaciones cada vez más estrictas, se requiere de un conocimiento detallado de la composición de los alimentos con la consiguiente demanda del desarrollo metodológico adecuado. En este contexto, existe la necesidad de utilizar métodos de análisis rápidos, no destructivos, que permitan monitorizar los procesos químicos que sufren los alimentos durante su manipulación, así como controlar las características de las materias primas y evaluar la preservación de su composición y propiedades durante los procesos de conservación y almacenamiento.

El objetivo de este trabajo fue determinar el potencial de la espectroscopía de ^1H -RMN y la sonda de HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*) para el análisis rápido y en muestras intactas, de los principales componentes del salmón ahumado (*Salmo salar*). Muestras (8-10 mg) de músculo de salmón ahumado fueron estudiadas a través de sus espectros de ^1H -RMN, adquiridos en pocos minutos, en los que se obtuvo su perfil metabólico. Los espectros mostraron la presencia de un gran número de componentes tanto mayoritarios como minoritarios (ácidos grasos, hidratos de carbono, derivados de nucleótidos, osmolitos, aminoácidos, dipéptidos y ácidos orgánicos). La estructura de la mayoría de estos compuestos fue determinada con exactitud gracias a la adquisición de experimentos de RMN 1D y 2D, lo que permitió generar un amplio listado de asignación de los metabolitos presentes en este tipo de muestras. Los espectros obtenidos tuvieron la suficiente resolución espectral para permitir por primera vez la determinación semicuantitativa en el músculo intacto, de los ácidos grasos poliinsaturados (ω -3). El método fue aplicado posteriormente al estudio de los cambios en el perfil metabólico del salmón ahumado durante su conservación (hasta 45 días) en refrigeración (4 °C). Los datos obtenidos permitieron monitorizar las transformaciones químicas producidas y evaluar la frescura.

En conclusión, la espectroscopía de ^1H -RMN/HRMAS, es una técnica rápida y eficaz para el análisis directo y no destructivo del músculo de salmón ahumado intacto y permite monitorizar los cambios producidos durante su almacenamiento. Por otro lado, este trabajo puso de manifiesto la idoneidad de la espectroscopía de ^1H -RMN/HRMAS como herramienta para poder evaluar los

efectos de los diferentes métodos de conservación utilizados habitualmente en la industria alimentaria.



Trabajo 4

^1H -HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*)

Magn. Reson. Chem. **2010**, *48*, 693-703

Research Article

Received: 10 January 2010

Revised: 6 June 2010

Accepted: 10 June 2010

Published online in Wiley InterScience: 18 July 2010

(www.interscience.com) DOI 10.1002/mrc.2652

¹H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*)

David Castejón,^a Palmira Villa,^a Marta M. Calvo,^b Guillermo Santa-María,^b Marta Herraiz^b and Antonio Herrera^{a,c*}

High-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopic data of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) were fully assigned by combination of one- and two-dimensional-HRMAS experiments. Complete representative spectra, obtained after few minutes of analysis time, revealed a large number of minor and major compounds in the sample. The methodology is limited by the low sensitivity of NMR, and therefore HRMAS only enables the determination of the most relevant components. These were fatty acids (FAs), carbohydrates, nucleoside derivatives, osmolytes, amino acids, dipeptides and organic acids. For the first time, spectra were resolved sufficiently to allow semiquantitative determination in intact muscle of the highly polyunsaturated FA 22:6 ω -3. Additionally, the feasibility of ¹H-HRMAS NMR metabolite profiling was tested to identify some bioactive compounds during storage. This profiling was carried out by the non-destructive and direct analysis (i.e. without requiring sample preparation and multiple step procedures) of intact salmon muscle. The proposed procedure can be applied to a large number of samples with high throughput due to the short time of analysis and quick evaluation of the data. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: NMR; HRMAS; salmon; food science; metabolomic

Introduction

In recent years, NMR has demonstrated its potential to reveal a wide variety of structural as well as compositional aspects of food science.^[1–4] In fact, several papers have reported the use of NMR spectroscopy in food analysis covering a broad range of complex samples.^[5–9]

Also, the suitability of NMR spectroscopy to study the metabolite profile in complex biological mixtures has been demonstrated.^[10–12] This analysis is clearly superior to more conventional techniques, which often involve laborious sample preparation steps and procedures that add uncertainty in the identification of metabolites. Interestingly, NMR methodology offers the possibility of detecting specific organic and biological compounds, also identifying important but unexpected or previously unknown metabolites. It is now widely recognized that NMR can overcome the constraints of traditional metabolic investigations during the analysis of a comprehensive range of compounds with minimal sample preparation.^[13–15]

The analysis of heterogeneous lipid mixtures including the nutritional evaluation and quality control of fish products by NMR has been tested. In particular, ¹³C and ¹H-NMR data have been earlier proposed for quality assessment and compositional analysis of Atlantic salmon.^[16–21]

The use of high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy has already been shown to eliminate dipole–dipole couplings and, consequently, to significantly reduce line broadening in the recorded spectra. This results in increased signal-to-noise ratio and improved resolutions. Moreover, HRMAS-NMR allows the non-destructive study of intact tissue and gives accurate chemical shifts.^[22,23]

Aursand *et al.*^[24] reported the first application of ¹H-HRMAS NMR on intact Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle and pointed out its excellent ability to determine the total content of ω -3 fatty acids (FAs). Although the authors did not achieve sufficient resolution to quantify docosahexaenoic fatty acid (DHA) (22:6, ω -3 FA), they emphasized the necessity for further research to optimize HRMAS techniques to analyze fish and fish products without chemical pre-treatment.

There is need for a detailed knowledge of the composition of specific complex samples and an increased analytical reliability using rapid, non-destructive and chemically selective methods. Equally important, adequate controls of both transformation from biological raw material into product and preservation of composition and structure during storage guarantees correct evaluation of food material properties.

The objective of this work was to develop a method using HRMAS methodology to rapidly detect the presence of the main components of smoked salmon, in small samples and with minimum preparation. This method was then to be applied to the study of the changes in the metabolite profile of smoked Atlantic

* Correspondence to: Antonio Herrera, Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: aherrera@quim.ucm.es

^a CAI-RMN, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI) – Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, c/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^c Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

salmon during storage. To this aim, a detailed assignment of NMR chemical shifts was necessary.

Experimental

Chemicals

D₂O (99.9%) and sodium (3-trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP) were purchased from SDS and Sigma–Aldrich, respectively.

Samples

Smoked Atlantic salmon (*S. salar*) from a local industry was immediately sliced and subsequently vacuum packaged to about 20 kPa in $\sim 10 \times 10$ cm laminated film bags having low gas permeability. The bags had diffusion coefficients of 35 and 150 cm³/24 h m² bar for oxygen and carbon dioxide, respectively. The vacuum-packed samples were stored at 4 °C until use. The effect of storage time on the metabolite profile was studied by analyzing three replicate samples stored for 0, 7, 15, 30 and 45 days after the purchase, representing a total of 15 separate analyses.

NMR experiments

About 8–10 mg of the white muscle of smoked Atlantic salmon was examined using HRMAS at 4 °C to minimize tissue deterioration and avoid degradation of thermolabile compounds. ¹H-HRMAS NMR spectroscopy was carried out at 500.13 MHz using a Bruker AMX500 spectrometer 11.7 T.

The samples were placed into a 50 µl zirconium oxide rotor with a cylindrical insert, together with 20 µl of 0.1 mM solution of TSP in D₂O. Experimental runs were performed at the lowest possible spinning rates to minimize structural or chemical changes during analysis.^[24]

Standard solvent suppressed spectra (NOESYPRESAT) were acquired into 16 k data points, averaged over 128 acquisitions. The total acquisition time was ~ 7 min, with a relaxation delay of 2 s, a mixing time of 150 ms and a spectral width of 8333 Hz. All spectra were processed using TOPSPIN software, version 1.3 (Bruker Rheinstetten, Germany). Prior to Fourier transformation, the FIDs were multiplied by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz. Spectra were phased, baseline-corrected and referenced to the TSP at $\delta = 0$ ppm.

Two-dimensional (2D) NMR experiments were measured on the salmon sample, and the resulting 2D spectra were used to assist in assigning signals from ¹H-HRMAS NMR spectra. Between consecutive 2D spectra, a control ¹H NMR spectrum was always measured. Analysis carried out within 24 h did not produce appreciable differences in one-dimensional (1D) experiments.

COSY-HRMAS

These experiments were acquired under following conditions: water presaturation during 1 s relaxation delay, a spectral width of 8333 Hz in both dimensions, 2 k data points in f_2 and 384 increments in f_1 . An unshifted sinusoidal window function was applied in both dimensions and zero filling in f_1 dimension.

TOCSY-HRMAS

These experiments were registered in TPPI phase sensitive mode, with water presaturation during 1-s relaxation delay, a spectral width of 8333 Hz in both dimensions, a 70 ms mixing time, 2 k data points in f_2 and 384 increments in f_1 . Zero filling in f_1 and unshifted squared sinusoidal window function in both dimensions were applied before Fourier transformation.

HSQC-HRMAS

Gradient-selected HSQC experiments were registered with the following parameters: 95 µs for GARP ¹³C decoupling, 8333 Hz and 21 kHz spectral widths in the ¹H and ¹³C dimensions, respectively, 2 k data points in f_2 and 256 increments in f_1 . Zero filling in f_1 and unshifted squared sinusoidal window function in both dimensions were applied before Fourier transformation.

Results and Discussion

Figure 1 represents the 500 MHz ¹H-HRMAS spectrum obtained from smoked salmon. Its resolution allows assignments of signals to FAs, triacylglycerides and phospholipids and also establishes the presence of carbohydrates, nucleoside derivatives, osmolytes, amino acids, dipeptides and organic acids. Table 1 lists the assignment of the signals according to the results obtained directly from the ¹H-HRMAS spectrum together with homonuclear 2D correlations (COSY-HRMAS, TOCSY-HRMAS) as well. Some ambiguities, as for example singlet signals from compounds that do not give ¹H,¹H-correlations, were resolved by HSQC-HRMAS experiments. Our assignments are based on different published data for the reference standards.^[11,12,16] The information obtained from the different recorded spectra led to the identification of additional compounds not previously found in organic extracts from white muscle of Atlantic salmon.^[11] Table 1 contains data from samples analyzed immediately after the purchase date and from samples stored during different periods of time as well. Although MAS is a direct measurement and mixing was not possible, it is interesting to notice that results obtained from three replicates showed good repeatability independently of the days of storage. Results are discussed below by class and type of compounds found in the ¹H-HRMAS spectra.

Fatty acids

Resonances representing FAs, triglycerides (TGs), phospholipids and other muscle metabolites are much broader than other signals; this is most likely due to their abundance and restricted mobility. In spite of this, ¹H-HRMAS at 500 MHz permits an easy identification of the different FAs present in the sample. FAs have already been studied extensively by ¹³C-NMR,^[16,17,25] supplying information about the individual ω -3 FAs, 18:2 ω -6, the ratio 20:1/22:1 and different groups of FAs. The quantitative data compare favorably with those obtained by gas chromatography. The major advantage of ¹H-NMR spectroscopy with respect to studies of ¹³C and ³¹P nuclei is higher sensitivity; this allows shorter acquisition times per experiment. In addition, protons are present in nearly all compounds, and the spectra therefore reflect the complete composition of the tissue studied.

Using 1D and 2D HRMAS experiments, we assigned 16 signals corresponding to unique proton environments for FAs

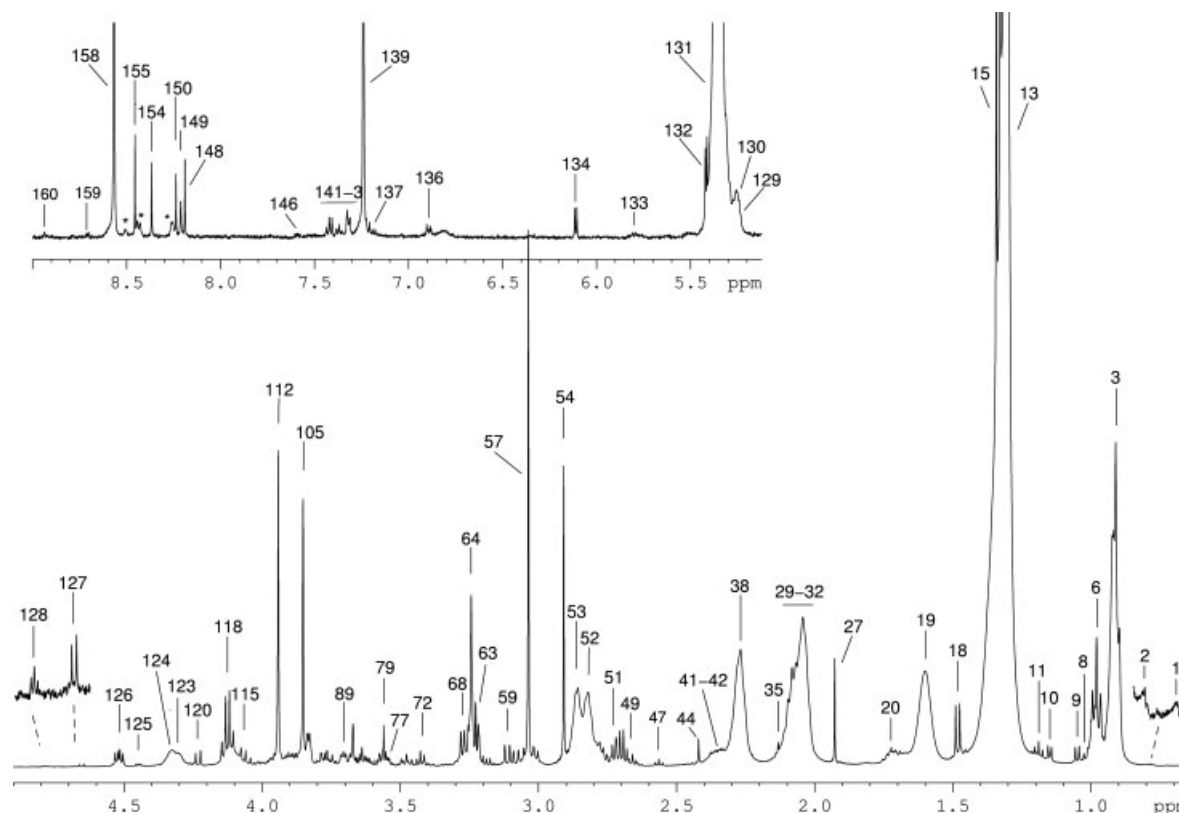


Figure 1. ¹H-HRMAS NMR spectrum of white muscle from smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). Assignments for the numbered resonances are given in Table 1.

in the sample. Table 1 includes their chemical shifts and scalar correlations found as well.

Figure 1 shows the presence of saturated fatty chains (signals 3, 13, 19, 38), monounsaturated fatty chains (signals 3, 38, 131), linoleic fatty chain C18:2 (signals 3, 38, 52, 131), linolenic fatty chain C18:3 (signals 6, 38, 131), eicosapentaenoic fatty acid chain C20:5 (EPA) (signals 6, 20, 32, 38, 131) and docosahexaenoic fatty acid chain C22:6 (DHA) (signals 6, 31, 41, 42, 131). Moreover, signals from glyceryl moiety (signals overlapped 117, 123, 130) can also be observed in Fig. 1 as well as from phospholipids (glycerophosphocholine moiety, signal 89, overlapped 124), confirmed by ¹H,¹H-COSY (Fig. 2(A)).

FAs with α -methylene groups with respect to double bonds give signals in the range 2.15–2.00 ppm (signals 29–32, Fig. 1). This assignment was confirmed with COSY and TOCSY-HRMAS experiments which show the appropriate cross-peaks in 2D spectra (see Supporting Information).

Data from ¹H-NMR spectra reported by other authors from extracts of FAs^[26] as well as data from ¹H-HRMAS spectrum (signals 41–42, Fig. 1) do not show differences in DHA between signals of methylene groups in α and β position with respect to the carboxylic group. However, we have found that HSQC-HRMAS permits unambiguous assignment for both methylene signals (see Supporting Information).

The resolution of the ¹H-HRMAS spectrum is sufficiently high to clearly show the characteristic triplet of ω -3 FAs (signal 6, Fig. 1). Semiquantitative analysis of the total ω -3 acid content was obtained by integrating the unique methyl proton in the HRMAS spectrum. Comparison of this integral with that of all other terminal methyl groups of FAs (TFA, signal 3) yielded the ratio of

ω -3 to TFA. From these data as well as from those resulting from the integration of the overlapped signals 41–42 from methylene groups, we were able to establish the ratios of DHA to both ω -3 and TFA.

These results show that ¹H-HRMAS analysis is capable of determining the ratio between DHA and ω -3 FAs in the intact sample. The ratio obtained in the present work from three replicates (DHA/ ω -3 = 0.31 \pm 0.4) is in agreement with that of Aursand *et al.*^[16] (DHA/ ω -3 = 0.32) from the ¹H-NMR spectrum of a lipid extract, although it is well known that FA composition of fish lipids depends on factors such as diet, season, part and tissue of the body.^[13] These determinations are important since ω -3, and particularly EPA and DHA, is believed to play a preventive role in cardiovascular diseases and alleviation of other health problems.^[24]

Table S1, Supporting Information, summarizes the assigned signals from FAs detected.

Carbohydrates

A number of signals from sugar moieties were previously assigned from a perchloric acid extract from Atlantic salmon.^[11] In the present study, we have additionally detected the presence of sucrose by using ¹H-HRMAS. Figure 1 shows characteristic signals from sucrose (CH-1 glucose ring, signal 132; CH-3 and CH-4 fructose ring, signals 120 and 115, respectively), α -glucose (CH-1, overlapped signal 129) and β -glucose (CH-1, signal 127). Some of these assignments were confirmed with the help of 2D ¹H,¹H-COSY HRMAS experiments (Fig. 2(A) and (B)) as indicated in Table 1.

Figure 2(A) and (B) show the ¹H,¹H-COSY HRMAS spectra obtained from intact muscle immediately after the purchase date (0 days) and after 30 days of storage, respectively. Clear

Table 1. Signal assignments for ^1H -HRMAS NMR spectrum from white muscle of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*)

Peak	Compound	Group	^1H (ppm)	Mult.: J (Hz)	Assignment data
1	Cholesterol (Chol)	CH_3	0.64	s	^1H ; HSQC (11,92)
2	Not identified (NI)	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	0.78	t	^1H
3	Fatty acids (FA)	CH_3	0.91	t	^1H ; COSY (1.30)
4	Isoleucine (Ile)	$\delta\text{-CH}_3$	0.94		COSY (1.27; 1.48)
5	Leucine (Leu)	$\delta\text{-CH}_3/\delta'\text{-CH}_3$	0.97	d	COSY (1.72); TOCSY (3.74)
6	Fatty acids (ω -3)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	0.98	t : 7.3	^1H ; COSY (2.09); TOCSY (2.79; 5.35)
7	Valine (Val)	$\gamma\text{-CH}_3$	0.99	d : 7.0	^1H ; COSY (2.29); TOCSY (3.61)
8	Isoleucine (Ile)	$\gamma\text{-CH}_3$	1.02	d : 7.1	^1H ; COSY (1.98); TOCSY (3.68)
9	Valine (Val)	$\gamma'\text{-CH}_3$	1.05	d : 7.0	^1H ; COSY (2.29); TOCSY (0.99; 1.05)
10	Not identified (NI)		1.15	d : 6.1	^1H ; COSY (3.63)
11	Ethanol	CH_3	1.19	t : 7.1	^1H ; COSY (3.66)
12	Isoleucine (Ile)	$\gamma\text{-CH}_2$	1.27		COSY (1.02)
13	Fatty acids (FA)	$(\text{CH}_2)_n$	1.30		^1H ; COSY (1.60; 2.04); TOCSY (2.27; 5.35)
14	Threonine (Thr)	$\gamma\text{-CH}_3$	1.33		COSY (4.26); TOCSY (3.58)
15	Lactic acid (LA)	$\beta\text{-CH}_3$	1.34	d : 6.9	^1H ; COSY (4.12)
16	Lysine (Lys)	$\gamma\text{-CH}_2$	1.47	m	COSY (1.71; 1.91); TOCSY (3.02)
17	Isoleucine (Ile)	$\gamma\text{-CH}_2$	1.48		COSY (1.02)
18	Alanine (Ala)	$\beta\text{-CH}_3$	1.48	d : 7.3	^1H ; COSY (3.78)
19	Fatty acids (FA)	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$	1.60		^1H ; COSY (1.30; 2.27)
20	Eicosapentaenoic fatty acid (ω -3; EPA C20:5)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$	1.67		^1H ; COSY (2.13; 2.27)
21	Lysine (Lys)	$\delta\text{-CH}_2$	1.71		COSY (1.47; 3.02); TOCSY (1.91)
22	Leucine (Leu)	$\gamma\text{-CH}$	1.72		COSY (0.97)
23	Leucine (Leu)	$\beta\text{-CH}_2$	1.72		COSY (3.74)
24	Not identified (NI)		1.80		^1H ; COSY (3.70)
25	Lysine (Lys)	$\beta\text{-CH}_2$	1.91		COSY (1.47; 3.77); TOCSY (1.71; 3.02)
26	γ -Aminobutyric acid (GABA)	$\beta\text{-CH}_2$	1.91	qu	COSY (2.31; 3.01)
27	Acetic acid (AA)	CH_3	1.93	s	^1H
28	Isoleucine (Ile)	$\beta\text{-CH}$	1.98		COSY (1.02)
29	Unsaturated fatty acids (UFA)	$(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n$	2.04		^1H ; COSY (1.30; 5.35)
30	Linoleic acid (ω -6; C18:2; DUFA)	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	2.08		^1H ; COSY (1.30; 5.35); TOCSY (2.80)
31	Unsaturated fatty acids (ω -3)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	2.09		^1H ; COSY (0.98; 5.35); TOCSY (2.83)
32	Eicosapentaenoic fatty acid (ω -3; EPA C20:5)	$\text{ROOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$	2.12		^1H ; COSY (1.67; 5.35)
33	Glutamate (Glu)	$\beta\text{-CH}_2$	2.07		COSY (2.36; 3.77)
34	Glutamate (Glu)	$\beta'\text{-CH}_2$	2.13		COSY (2.36; 3.77)
35	Methionine (Met)	S-CH_3	2.13	s	^1H ; HSQC (14.00)
36	Glutamine (Gln)	$\beta, \beta'\text{-CH}_2$	2.14		COSY (2.44; 3.78)
37	Methionine (Met)	$\beta\text{-CH}_2$	2.17		COSY (2.64; 3.88)
38	Fatty acids (FA)	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$	2.27		^1H ; COSY (1.60); TOCSY (1.30)
39	Valine (Val)	$\beta\text{-CH}$	2.29	m	COSY (0.99; 1.05; 3.62)
40	γ -Aminobutyric acid (GABA)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.31	m	COSY (1.91)
41	Docosahexaenoic fatty acid (ω -3; DHA C22:6)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$	2.35		^1H ; TOCSY (2.86; 5.35); HSQC (33,15)
42	Docosahexaenoic fatty acid (ω -3; DHA C22:6)	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$	2.35		^1H ; COSY (5.35); TOCSY (2.86); HSQC (21,62)
43	Glutamate (Glu)	$\beta\text{-CH}_2$	2.36		COSY (2.11); TOCSY (3.77)
44	Succinic acid (SA)	$\alpha, \beta\text{-CH}_2$	2.42	s	^1H ; HSQC (34.60)
45	Glutamine (Gln)	$\beta\text{-CH}_2$	2.44	m	COSY (2.14); TOCSY (3.78)
46	Not identified (NI)		2.45		COSY (3.81)

Table 1. (Continued)

Peak	Compound	Group	¹ H (ppm)	Mult.: J (Hz)	Assignment data
47	Not identified (NI)		2.56	t: 6.7	COSY (3.18)
48	Methionine (Met)	γ -CH ₂	2.64		COSY (2.17)
49	Aspartic acid (Asp)	β -CH ₂	2.69		¹ H; COSY (3.90)
50	Anserine (Ans)	β -CH ₂ (β -Ala)	2.71	m	¹ H; COSY (3.23)
51	Aspartic acid (Asp)	β' -CH ₂	2.78		¹ H; COSY (3.90)
52	Linoleic acid (ω -6; C18:2; DUFA)	CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂	2.79		¹ H; COSY (5.35); TOCSY (0.98; 1.30; 2.09)
53	Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA)	CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH	2.83		¹ H; COSY (5.35); TOCSY (2.04; 2.35)
54	Trimethylamine (TMA)	N-CH ₃	2.91	s	¹ H; HSQC (45.62)
55	γ -Aminobutyric acid (GABA)	γ -CH ₂	3.01	m	COSY (1.91)
56	Lysine (Lys)	ϵ -CH ₂	3.02	m	COSY (1.71); TOCSY (1.47; 1.91; 3.77)
57	Creatine/phosphocreatine (Cr/PCr)	N-CH ₃	3.04	s	¹ H; HSQC (37.02)
58	Tyrosine (Tyr)	β -CH ₂	3.06		COSY (3.94)
59	Anserine (Ans)	β -CH ₂ (His)	3.10	m	¹ H; COSY (4.52)
60	Phenylalanine (Phe)	β -CH ₂	3.13		COSY (3.99)
61	Not Identified (NI)		3.18		COSY (2.56)
62	Tyrosine (Tyr)	β -CH ₂	3.21		COSY (3.94)
63	Choline (Cho)	N-CH ₃	3.21	s	¹ H; HSQC (68.32)
64	Anserine (Ans)	α -CH ₂ (β -Ala)	3.23	m	¹ H; COSY (2.71)
65	Phosphorylcholine (PCho)/Glycerophosphorylcholine (GPCho)	N-CH ₃	3.24		¹ H; HSQC (54.73)
66	β -Glucose (β -Glc)	CH-2	3.24		COSY (4.65)
67	Anserine (Ans)	β' -CH ₂ (His)	3.26		COSY (4.52)
68	Taurine (Tau)	S-CH ₂	3.26	t	¹ H; COSY (3.42)
69	Phenylalanine (Phe)	β -CH ₂	3.27		COSY (3.99)
70	Trimethylamine oxide (TMAO)	N-CH ₃	3.28	s	¹ H; HSQC (60.10)
71	α -Glucose (α -Glc)	CH-4	3.41		TOCSY (5.24)
72	Taurine (Tau)	N-CH ₂	3.42	t: 6.7	¹ H; COSY (3.26)
73	β -Glucose (β -Glc)	CH-4	3.42		HSQC (70.50)
74	Sucrose (Suc)	CH-4 (Glu)	3.47		COSY (3.78); TOCSY (5.42)
75	β -Glucose (β -Glc)	CH-3	3.47		TOCSY (4.65)
76	β -Glucose (β -Glc)	CH-5	3.51		HSQC (76.50)
77	Choline (Cho)	β -CH ₂	3.54		¹ H; COSY (4.07); HSQC (67.24)
78	α -Glucose (α -Glc)	CH-2	3.54		COSY (5.24)
79	Glycine (Gly)	α -CH	3.55	s	¹ H; HSQC (41.60)
80	Sucrose (Suc)	CH-2 (Glu)	3.56		COSY (3.78; 5.42)
81	Threonine (Thr)	α -CH	3.58	d	COSY (4.26); TOCSY (1.33)
82	Valine (Val)	α -CH	3.61	d	COSY (2.29); TOCSY (0.99; 1.05)
83	Phosphorylcholine (PCho)	β -CH ₂	3.62		COSY (4.19); HSQC (66.87)
84	Not Identified (NI)		3.63		COSY (1.15)
85	Ethanol	CH ₂ -1	3.66		COSY (1.20)
86	Sucrose (Suc)	CH ₂ -1 (Fru)	3.67		Bibliography
87	Isoleucine (Ile)	α -CH	3.68		COSY (1.98); TOCSY (1.02)
88	Not Identified (NI)		3.69		¹ H; COSY (1.80)
89	Glycerophosphorylcholine (GPCho)	β -CH ₂	3.70		¹ H; COSY (4.33); HSQC (54.72)
90	Sucrose (Suc)	CH ₂ -6	3.70		Bibliography
91	α -Glucose (α -Glc)	CH-3	3.72		TOCSY (5.23)
92	β -Glucose (β -Glc)	CH ₂ -6,6'	3.73		TOCSY (4.65)
93	Sucrose (Suc)	CH ₂ -6 (Fru)	3.73		COSY (3.90)
94	Leucine (Leu)	α -CH	3.74	m	COSY (1.72); TOCSY (0.97)
95	Lysine (Lys)	α -CH	3.77	t	COSY (1.91); TOCSY (3.02)
96	Glutamate (Glu)	α -CH	3.77	m	COSY (2.11); TOCSY (2.36)
97	α -Glucose (α -Glc)	CH ₂ -6,6'	3.77		HSQC (61.10)

Table 1. (Continued)

Peak	Compound	Group	¹ H (ppm)	Mult.: J (Hz)	Assignment data
98	Glutamine (Gln)	α -CH	3.78	m	COSY (2.14); TOCSY (2.44)
99	Sucrose (Suc)	CH-3 (Glu)	3.78		COSY (3.47; 3.56); TOCSY (5.42)
100	Alanine (Ala)	α -CH	3.78		COSY (1.48)
101	Not identified (NI)		3.81		¹ H; COSY (2.45)
102	Sucrose (Suc)	CH-5 (Glu)	3.84		COSY (3.47)
103	α -Glucose (α -Glc)	CH-5	3.84		TOCSY (5.23)
104	α -Glucose (α -Glc)	CH ₂ -6,6'	3.84		HSQC (61.10)
105	Anserine (Ans)	N-CH ₃	3.85	s	¹ H; HSQC (33.5)
106	Sucrose (Suc)	CH ₂ -6 (Glu)	3.85		Bibliography
107	Inosine (Ino)	CH ₂ -5 (Rib)	3.88		COSY (4.29); TOCSY (4.45)
108	Methionine (Met)	α -CH	3.88		COSY (2.17)
109	β -Glucose (β -Glc)	CH ₂ -6,6'	3.89		TOCSY (4.65)
110	Sucrose (Suc; fructose ring)	CH-5 (Fru)	3.90		COSY (3.73; 4.06)
111	Aspartic Acid (Asp)	α -CH	3.90		COSY (2.69; 2.78)
112	Creatine/phosphocreatine (Cr/PCr)	α -CH ₂	3.94	s	¹ H; HSQC (53.8)
113	Tyrosine (Tyr)	α -CH	3.94		COSY (3.06; 3.21)
114	Phenylalanine (Phe)	α -CH	3.99		COSY (3.13; 3.27)
115	Sucrose (Suc)	CH-4 (Fru)	4.06	t	¹ H; COSY (3.90; 4.23)
116	Choline (Cho)	α -CH ₂	4.07		COSY (3.54)
117	Triglycerides (TG)	CH ₂ - α (Gly)	4.12		¹ H; COSY (4.31; 5.25)
118	Lactic acid (La)	α -CH	4.12	q: 6.9	¹ H; COSY (1.34)
119	Phosphorylcholine (PCho)	α -CH ₂	4.19		COSY (3.62); HSQC (56.20)
120	Sucrose (Suc)	CH-3 (Fru)	4.23	d	¹ H; COSY (4.06)
121	Threonine (Thr)	α -CH	4.26	m	COSY (3.58)
122	Inosine (Ino)	CH-4 (Rib)	4.29	t	¹ H; COSY (4.45); TOCSY (4.79)
123	Triglycerides (TG)	CH ₂ - α' (Gly)	4.31		¹ H; COSY (4.12; 5.25)
124	Glycerophosphorylcholine (GPCho)	α -CH ₂	4.33		¹ H; COSY (3.70); HSQC (60.10)
125	Inosine (Ino)	CH-3 (Rib)	4.45	t	¹ H; COSY (4.29; 4.79); TOCSY (3.88; 6.12)
126	Anserine (Ans)	α -CH (His)	4.52	m	¹ H; COSY (3.10; 3.26)
127	β -Glucose (β -Glc)	CH-1	4.65	d: 7.9	¹ H; COSY (3.25); TOCSY (3.42; 3.47; 3.51)
128	Inosine (Ino)	CH-2 (Rib)	4.79	t	¹ H; COSY (4.45; 6.11); TOCSY (4.29)
129	α -Glucose (α -Glc)	CH-1	5.23	d: 3.6	¹ H; COSY (3.54); TOCSY (3.41; 3.72; 3.84)
130	Triglycerides (TG)	CH (Gly)	5.25		¹ H; COSY (4.12; 4.31)
131	Unsaturated fatty acids (UFA)	CH=CH	5.35		¹ H; COSY (2.04; 2.79; 2.83); TOCSY (0.98; 1.30; 2.35)
132	Sucrose (Suc)	CH-1 (Glu)	5.42	d: 3.8	¹ H; COSY (3.56); TOCSY (3.47; 3.78)
133	Uracil	CH-6	5.80		¹ H; COSY (7.53)
134	Inosine (Ino)	CH-1 (Rib)	6.11	d: 5.7	¹ H; COSY (4.79); TOCSY (4.29; 4.45)
135	Fumaric acid (FA)	α,β CH=CH	6.53	s	¹ H; Bibliography
136	Tyrosine (Tyr)	CH-3,5	6.89	d: 8.5	¹ H; COSY (7.19)
137	Tyrosine (Tyr)	CH-2,6	7.19	d: 8.5	¹ H; COSY (6.89)
138	Tryptophan (Trp)	CH-6	7.19		COSY (7.73)
139	Anserine (Ans)	CH-5 (His)	7.24	s	¹ H; COSY (3.10; 3.26; 8.57)
140	Tryptophan (Trp)	CH-5	7.27		COSY (7.53); TOCSY (7.73)
141	Phenylalanine (Phe)	CH-2,6	7.32	m	¹ H; COSY (7.42)
142	Phenylalanine (Phe)	CH-4	7.39	m	¹ H; HSQC (128.58)
143	Phenylalanine (Phe)	CH-3,5	7.42	m	¹ H; COSY (7.32)
144	Tryptophan (Trp)	CH-7	7.53		COSY (7.27); TOCSY (7.19; 7.73)
145	Uracil	CH-5	7.53		¹ H; COSY (5.80)
146	Niacin	CH-5	7.60	dd	¹ H; COSY (8.25; 8.72)

Table 1. (Continued)

Peak	Compound	Group	¹ H (ppm)	Mult.: J (Hz)	Assignment data
147	Tryptophan (Trp)	CH-4	7.73		COSY (7.19); TOCSY (7.27; 7.53)
148	Hypoxanthine (Hx)	CH-8	8.19	s	¹ H; HSQC (146.17)
149	Hypoxanthine (Hx)	CH-2	8.21	s	¹ H; HSQC (142.62)
150	Inosine (Ino)	CH-8 (Purin)	8.24	s	¹ H; HSQC (146.90)
151	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-8	8.25	s	¹ H; Bibliography
152	Niacin	CH-4	8.25	d	¹ H; COSY (7.60); TOCSY (8.72)
153	Adenosine tri/triphosphate (ATP/ADP)	CH-8	8.27	s	¹ H; Bibliography
154	Inosine (Ino)	CH-3 (Purin)	8.37	s	¹ H; HSQC (140.80)
155	Formic acid (FA)	CH	8.45	s	¹ H; Bibliography
156	Adenosine tri/triphosphate (ATP/ADP)	CH-2	8.49	s	¹ H; Bibliography
157	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-2	8.51	s	¹ H; Bibliography
158	Anserine (Ans)	CH-2 (His)	8.57	s	¹ H; COSY (7.24)
159	Niacin	CH-6	8.72	d	¹ H; COSY (7.60); TOCSY (8.25)
160	Niacin	CH-2	8.94	s	¹ H; HSQC (149.50)

s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; qu, quintet; m, multiplet; dd, doublet of doublets.

differences can be observed in the important zone of anomeric protons between 5.50 and 4.50 ppm (sucrose, α -glucose and β -glucose). Additional changes can also be seen in the zone between 4.25 and 3.00 ppm corresponding to other CHOH groups from the sugar moiety. This region is indicated in Fig. 2(A) and (B) with a dotted line square. Also in Fig. 2(A) are indicated (continuous line square) those cross-peaks occurring in the sample labeled as 0 days which are absent in Fig. 2(B) due to the degradation process during storage.

The degradation of sugars was clearly shown in Fig. 3 by comparison of the ¹H-HRMAS spectra of samples stored over time (i.e. 0, 7, 15, 30 and 45 days). The spectral region between 6.20 and 4.0 ppm corresponds to the anomeric protons in sugar moieties. In addition to the anomeric doublets from α -glucose and β -glucose at 5.23 (signal 129 which overlaps with the broad signal 130 from TG) and 4.65 ppm (signal 127) respectively, already shown in Fig. 1, the characteristic diagnostic doublet at 5.42 ppm (signal 132) indicates the presence of sucrose. Figure 3 also shows how signals from sugars (115, 120, 127, 129, 132) diminish during storage and finally disappear after 30 days.

Nucleoside derivatives

The ¹H-HRMAS spectra in Figs 1 and 3 clearly show diagnostic singlets for hypoxanthine (Hx) at 8.21 and 8.19 ppm (signals 149 and 148, respectively), inosine (Ino) in samples stored up to 15 days, with singlets at 8.37 and 8.24 ppm (signals 154 and 150, respectively), a doublet at 6.11 ppm (signal 134) and triplets at 4.79 and 4.45 ppm (signals 128 and 125, respectively). Cross-peaks from Hx and Ino were also observed in COSY and TOCSY-HRMAS spectra (Table 1 and Figs 2(A), (B) and 4). The signals from Hx which are detectable in Atlantic salmon within 8 h after death,^[27] are always present in samples analyzed and increases its intensity with the storage time. Small signals from adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and inosine 5'-phosphate (IMP) are marked with (*) in Fig. 1. Spectra collected in Fig. 3 show changes in purine derivatives during the known degradation of

ATP according to the sequence: ATP → ADP → AMP → IMP → INO → HYP → xanthine → uric acid. In agreement with this sequence, the presence of INO (signals 154, 150, 134, 128, 125 in Fig. 1) decreases clearly with storage as shown in Fig. 3. In addition, the presence of choline (Cho) (63, 77 in Fig. 1; signal 116, Table 1) and phosphorylcholine (PCho) (signals 65, 83, 119, Table 1), whose metabolism leads to trimethylamine N-oxide (TMAO), can also be observed.

Osmolytes

The sharp singlet at 2.91 ppm (signal 54) which appears in Fig. 1 enabled us to identify the presence of trimethylamine (TMA), responsible for the unpleasant fish odor. TMAO (which degrades TMA during storage) plays an important role in the osmotic regulation of biofluids^[28] and its presence suggests a good preservation state. The measurement of TMA is of special interest. Although the presence of TMA in organic extracts obtained from fish samples has already been reported, its high volatility usually causes much of it to be lost during conventional analysis (i.e. with sample preconcentration and manipulation). As demonstrated in this work, the direct analysis of intact muscle avoids problems related to sample preparation when measuring metabolites that indicate freshness.

Amino acids and dipeptides

Several amino acids, namely isoleucine (Ile), leucine (Leu), valine (Val), threonine (Thr), lysine (Lys), alanine (Ala), glutamic acid (Glu), glutamine (Gln), methionine (Met), aspartic acid (Asp), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), glycine (Gly) and tryptophan (Trp) are assigned by combining the information resulting from 1D and 2D spectra. ¹H,¹H-COSY and ¹H,¹H-TOCSY included in Figs 2(A) and 4, respectively, show characteristic cross-peaks from Ile, Leu, Val, Thr, Lys, Ala, Glu, Gln, Met, Asp. The singlet methylene group of Gly was confirmed by HSQC cross-peak at 3.55–41.60 ppm. Aromatic signals for Tyr (136, 137) and Phe (141, 142, 143) were assigned

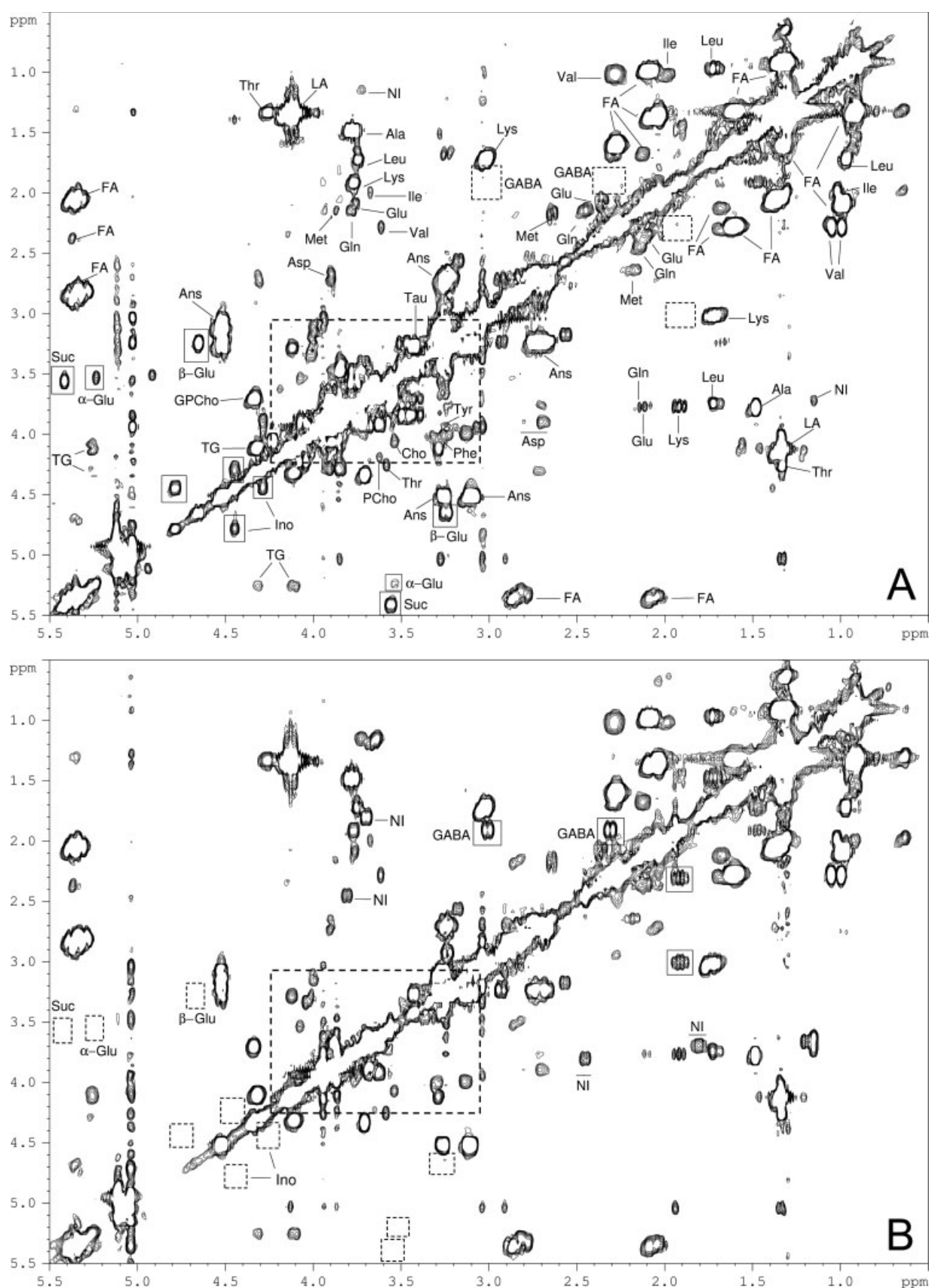


Figure 2. (A) Water-suppressed ^1H , ^1H -COSY HRMAS spectrum of white muscle from smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) obtained immediately after purchase date (0 days). (B) Water-suppressed ^1H , ^1H -COSY HRMAS spectrum of white muscle from smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored for 30 days.

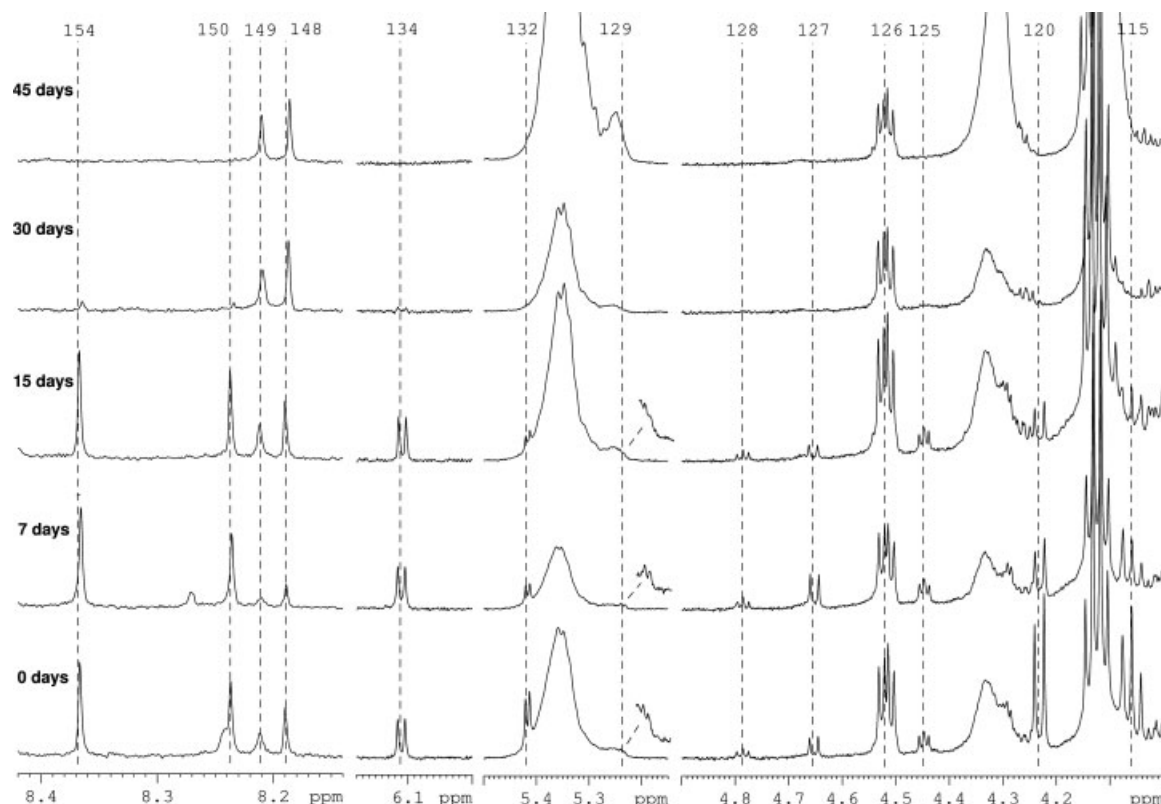


Figure 3. Expanded regions at 8.42–8.14, 6.20–6.00, 5.50–5.15 and 4.90–4.00 ppm of water-suppressed ¹H-HRMAS spectra from samples of white muscle from smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored at different times ranging from 0 to 45 days.

in the ¹H-HRMAS experiment (Fig. 1). The presence of Thr (14, 81, 121) and Trp (140, 144) could be detected from their respective cross-peaks in 2D-COSY and TOCSY experiments (Table 1). Our assignment on the aminoacids present in samples is in agreement with that very recently reported by other authors in a study of salmon extracts by HPLC.^[29]

Creatine (Cr) and phosphocreatine (PCr), important as energy sources, show overlapped singlets at 3.04 and 3.94 ppm (signals 57 and 112, Fig. 1). HSQC confirms their presence by cross-peaks at 3.04–37.02 and 3.94–53.80 ppm (Table 1). Figure 2(B) clearly shows well resolved new cross-peaks at 3.01–1.91 and 2.31–1.91 ppm that we assigned to GABA (signals 26, 40, 55, Table 1) absent in the ¹H,¹H-COSY HRMAS spectrum (dotted line squares), taken at 0 days storage, which is depicted in Fig. 2(A). Actually, its presence, which is produced by decarboxylation of glutamic acid, could only be observed after a minimum storage time of 7 days.

Figure 1 also contains aromatic signals from the histidine ring of anserine (Ans) (158, 139) as well as various additional peaks (126, α -CH), (105, N-CH₃), (64, α -CH₂). This dipeptide, which contributes to the intracellular buffering of the fish muscle, has been found to play an important role as antioxidant due to its properties as ion-chelating agent and free radical scavenging.^[25] Moreover, we have also detected the presence of niacin, also known as vitamin B₃ (146, 159, 160, Fig. 1), probably formed as a by-product of the metabolism of TRP.

Other organic acids

Various organic acids can be detected with the help of 2D experiments and literature data. Particularly, Fig. 1 shows singlets

from acetic acid at 1.93 ppm (signal 27) and succinic acid at 2.42 ppm (signal 44), as well as a characteristic quartet from lactic acid at 4.12 ppm (signal 118) which correlates (Fig. 4) with the doublet at 1.34 ppm. The HSQC cross-peak at 2.42–34.6 ppm (Table 1) confirms the presence of succinic acid. The amounts of fumaric and formic acids are close to the detection limit and their singlets at 6.53 and 8.45 ppm appear in some spectra (signals 135 and 155).

A small quantity of the pyrimidine derivative uracil was also detected (signals 133 and 145 in Table 1). Additionally, ethanol, a fermentative degradation product of sugars, was observed. Its presence increased with the storage. Figure 1 shows a triplet at 1.19 ppm from the methyl group (signal 11), and the ¹H,¹H-COSY experiment indicates a cross-peak at 1.19–3.66 ppm with the CH₂ group (Table 1).

Conclusions

¹H-HRMAS NMR spectroscopy proved to be a quick and valuable technology for performing rapid and non-destructive analysis of intact salmon muscle. Under the experimental conditions detailed in the text, resolutions achieved in the MAS spectra allowed an estimation of the amount of DHA (and other polyunsaturated FAs as well) by direct analysis. This avoided the preparation of a lipid extract as normally required in the methods used to date. The procedure reported here opens up new possibilities for determining ω -3 FAs in fish and processed fish products without any chemical pre-treatment. Analyte losses and degradation can be critical problems when measuring beneficial compounds, such as ω -3 FAs or osmolytes, among others. The amounts of these

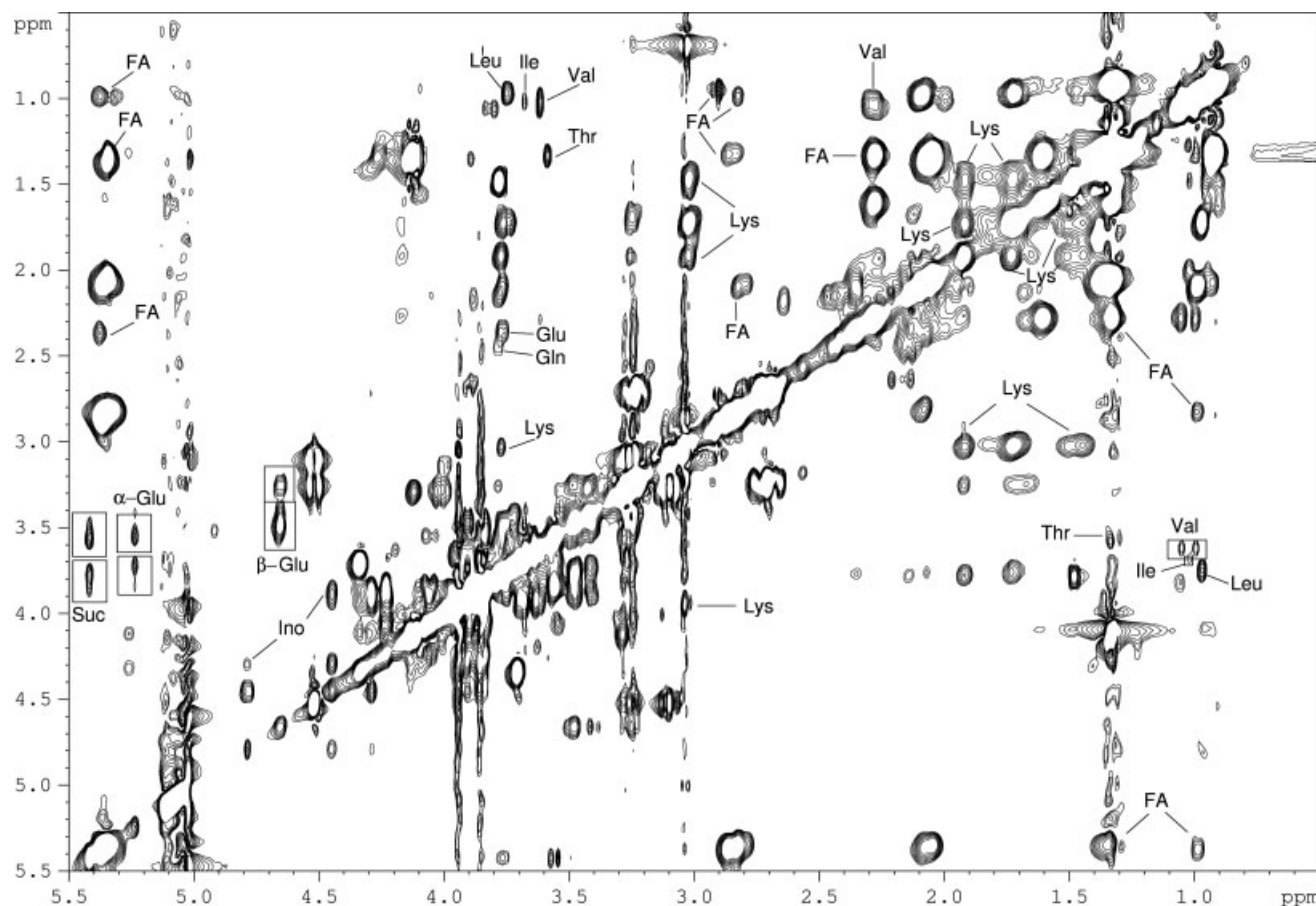


Figure 4. Water-suppressed ^1H , ^1H -TOCSY HRMAS spectrum of white muscle from smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored for 7 days.

compounds should be accurately reported to the consumer. Attention was focused on identifications of metabolites and changes in their levels. A complete assignment table was given. Data from the effects of storage were also obtained, so that freshness of the sample could be evaluated. Summarizing, our data provide relevant information that add to the data obtained from organic extracts of Atlantic salmon. The ^1H -HRMAS spectrum can be considered to be a metabolic profile of the whole sample. Consequently, ^1H -HRMAS NMR spectroscopy can be useful in evaluating variations in the metabolite profiles as a function of different salmon processing conditions. The relative speed of analysis and simple evaluation of the data suggest that ^1H -HRMAS could be applied to a large number of samples with high throughput. This aspect is currently under progress in our laboratory.

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Science and Technology Commission, Project Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00016-03) and the Comunidad de Madrid (Project CM S-0505/AGR-0314) is gratefully acknowledged. Authors also thank CAI de RMN y RSE de la UCM for measurements of NMR spectra.

Supporting information

Supporting information may be found in the online version of this article.

References

- [1] A. M. Gil, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (Ed.: B. Caballero), Elsevier: Amsterdam, **2003**, 5447.
- [2] G. L. Gall, I. J. Colquhoun, in *Food Authenticity and Traceability* (Ed.: M. Lees), Woodhead Publishing: Cambridge, **2003**, 131.
- [3] G. A. Webb (Ed.), *Modern Magnetic Resonance*, vols 1–3 Springer: New York, **2006**.
- [4] M. Guojonsdottir, P. Belton, G. Webb (Eds), *Magnetic Resonance in Food Science: Challenges in a Changing World*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2009**.
- [5] A. P. Sobolev, A. Segre, R. Lamanna, *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 237.
- [6] F. J. Hidalgo, R. Zamora, *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14*, 499.
- [7] H. C. Bertram, H. J. Andersen, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2004**, *53*, 157.
- [8] B. P. Hills, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2006**, *58*, 177.
- [9] R. Sacchi, L. Paolillo, in *Advances in Food Diagnostics* (Eds: L. M. L. Nollet, F. Toldrá), Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, **2007**, 101.
- [10] T. W.-M. Fan, *Prog. NMR Spectrosc.* **1996**, *28*, 161.
- [11] I. S. Gribbestad, M. Aursand, I. Martinez, *Aquaculture* **2005**, *250*, 445.
- [12] I. Martinez, T. Bathen, I. B. Standal, J. Halvorsen, M. Aursand, I. S. Gribbestad, D. E. Axelson, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6889.
- [13] L. Mannina, A. P. Sobolev, D. Capitani, N. Iaffaldano, M. P. Rosato, P. Ragni, A. Reale, E. Sorrentino, I. D'Amico, R. Coppola, *Talanta* **2008**, *77*, 433.
- [14] T. W.-M. Fan, A. N. Lane, *Prog. NMR Spectrosc.* **2008**, *52*, 69.
- [15] W. Tuffnail, G. A. Mills, P. Cary, R. Greenwood, *Metabolomics* **2009**, *5*, 33.
- [16] M. Aursand, J. R. Rainuzzo, H. Grasdalen, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 971.
- [17] M. Aursand, L. Jørgensen, H. Grasdalen, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 293.

¹H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*)

- [18] I. Martinez, M. Aursand, U. Erikson, T. E. Singstad, E. Veliyulin, C. van der Zwaag, *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14*, 489.
- [19] I. Martinez, I. B. Standal, D. E. Axelson, B. Finstad, M. Aursand. *Food Chem.* **2009**, *116*, 766.
- [20] M. Aursand, I. B. Standal, A. Praël, L. McEvoy, J. Irvine, D. E. Axelson, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3444.
- [21] I. B. Standal, D. E. Axelson, M. Aursand, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 401.
- [22] Q. X. Ni, T. M. Eads, *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1026.
- [23] Q. X. Ni, T. M. Eads, *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1035.
- [24] M. Aursand, I. S. Gribbestad, I. Martinez, in *Application in Chemistry, Biological and Marine Science*, vol. 1 (Ed.: G. A. Webb), Springer: New York, **2006**, 931.
- [25] M. Aursand, L. Jørgensen, H. Grasdalen, *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *112B*(2), 315.
- [26] M. D. Guillén, A. Ruiz, *Food Chem.* **2004**, *86*, 297.
- [27] D. Wang, J. Tang, L. R. Correia, T. A. Gill, *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 634.
- [28] H. Howell, Y. Shavila, M. Grootveld, S. Williams, *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *72*, 49.
- [29] K. Kousoulaki, S. Albrektsen, E. Langmyhr, H. J. Olsen, P. Campbell, A. Aksnes, *Aquaculture* **2009**, *289*, 74.

SUPPLEMENTARY DATA

(4 pages)

Manuscript entitled: ^1H -HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*).

David Castejón, Palmira Villa, Marta M. Calvo, Guillermo Santa-María,
Marta Herraiz, Antonio Herrera.

Table of contents

1) Table S1. Signals from Fatty Acid	p 2.
2) Fig. S1. Expansion of TOCSY-HRMAS	p.3.
3) Fig. S2. Expansion of HSQC-HRMAS	p.4.

1) Table S1 – Signals from Fatty Acid.

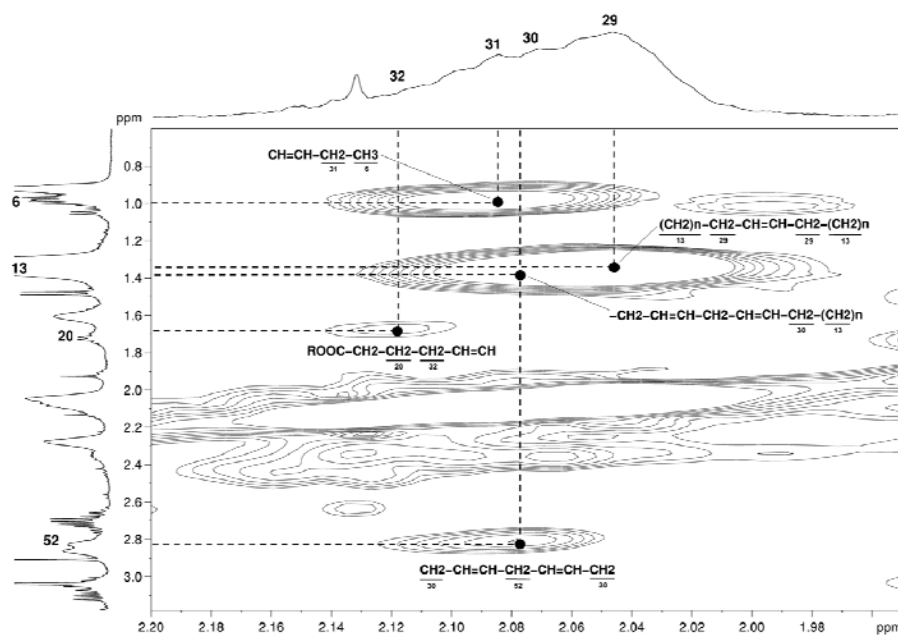
Table S1 summarizes the information regarding the signals from fatty acid detected.

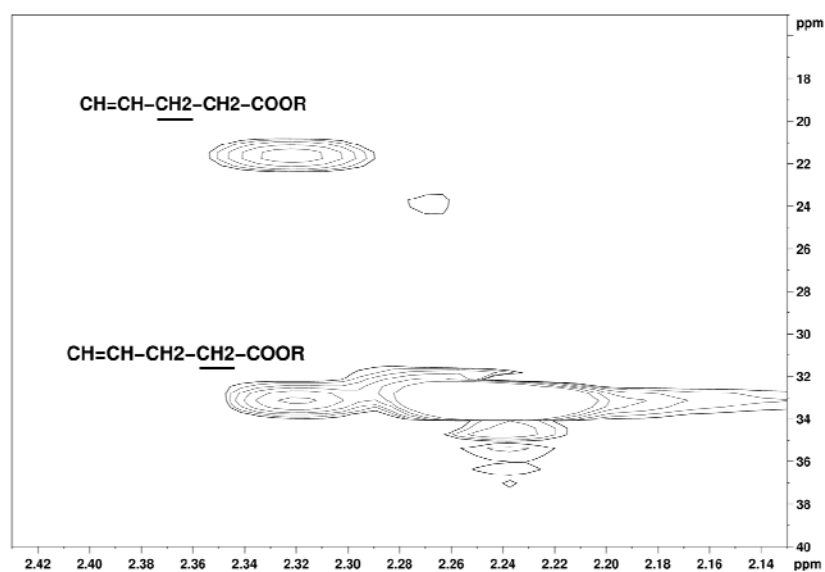
¹ H (ppm)	Compound	Group	Peak *
0.91	Fatty Acids (FA)	CH₃	3
0.98	Fatty Acids (ω -3)	CH=CH-CH ₂ - CH₃	6
1.30	Fatty Acids (FA)	(CH₂)_n	13
1.60	Fatty Acids (FA)	CH ₂ - CH₂ -CH ₂ -COOR	19
1.67	Eicosapentaenoic Fatty Acid (ω -3; EPA C20:5)	CH=CH-CH ₂ - CH₂ -CH ₂ -COOR	20
2.04	Unsaturated Fatty Acids (UFA)	(CH ₂) _n - CH₂ -CH=CH- CH₂ -(CH ₂) _n	29
2.08	Linoleic Acid (ω -6; C18:2; DUFA)	CH ₂ - CH₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH- CH₂ -CH ₂	30
2.09	Unsaturated Fatty Acids (ω -3)	CH=CH- CH₂ -CH ₃	31
2.12	Eicosapentaenoic Fatty Acid (ω -3; EPA C20:5)	ROOC-CH ₂ -CH ₂ - CH₂ -CH=CH	32
2.27	Fatty Acids (FA)	CH ₂ - CH₂ -COOR	38
2.35	Docosahexaenoic Fatty Acid (ω -3; DHA C22:6)	CH=CH-CH ₂ - CH₂ -COOR	41
2.35	Docosahexaenoic Fatty Acid (ω -3; DHA C22:6)	CH=CH- CH₂ -CH ₂ -COOR	42
2.79	Linoleic Acid (ω -6; C18:2; DUFA)	CH ₂ -CH=CH- CH₂ -CH=CH-CH ₂	52
2.83	Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA)	CH=CH- CH₂ -CH=CH- CH₂ -CH=CH	53
4.12	Triglycerides (TG)	CH₂-α (Gly)	117
4.31	Triglycerides (TG)	CH₂-α' (Gly)	123
5.25	Triglycerides (TG)	CH (Gly)	130
5.35	Unsaturated Fatty Acids (UFA)	CH=CH	131

* Peak number in Table 1.

2) Fig. S1. Expansion of TOCSY-HRMAS spectrum.

Unsaturated acids present cross-peak at 2.04-1.30 ppm from methylene groups in alpha position respect a double bond ($(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-(CH}_2)_n$). Specifically, linoleic acid (ω -6) present a cross-peak at 2.08-2.79 ppm from methylene group in alpha position to both double bonds ($\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$). Additionally, linoleic acid shows a cross-peak at 2.08-1.30 ppm from methylene groups alpha positioned to double bond ($\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-(CH}_2)_n$). ω -3 fatty acids present a cross-peak at 2.08-0.98 ppm specific from methylene group in alpha to double bond with the methyl group attached ($\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_3$). TOCSY spectrum shows a cross-peak at 2.12- 1.67 ppm from $\text{ROOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-}$ moiety in EPA.



3) Fig. S2. Expansion of HSQC-HRMAS spectrum.



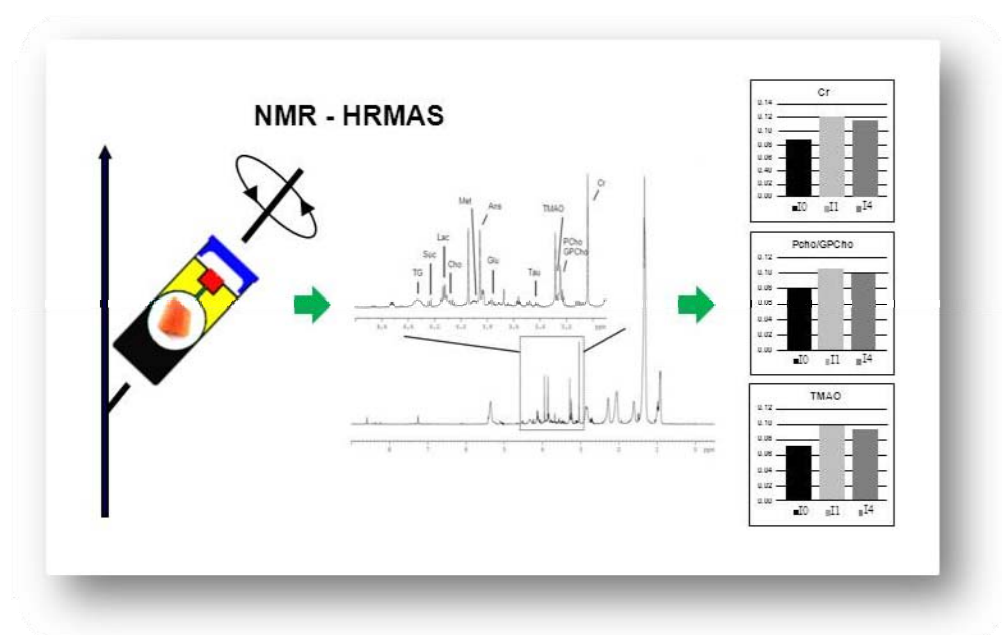
III.2.1.2: ESTUDIO MEDIANTE ^1H -RMN/HRMAS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE IRRADIACIÓN EN SALMÓN AHUMADO.

III.2.1.2: ESTUDIO MEDIANTE ^1H -RMN/HRMAS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE IRRADIACIÓN EN SALMÓN AHUMADO.

La irradiación es uno de los métodos de conservación que permite reducir la carga microbiana y aumentar la seguridad de los alimentos. Se trata de un procedimiento eficaz contra la mayoría de las bacterias patógenas y parásitos prolongando con ello, la vida útil del producto. Contrariamente a lo que ocurre con otros procedimientos de conservación, en el caso del uso de la irradiación existe una gran discrepancia en las legislaciones vigentes en los distintos países para regular este tratamiento, tanto en relación con los alimentos que pueden tratarse, como en el establecimiento de la dosis máxima permitida en cada caso. Es necesario por tanto, disponer de una metodología eficaz para la detección y control de alimentos irradiados. Los métodos que convencionalmente se utilizan para este fin se basan en los cambios físicos, químicos, biológicos y microbiológicos que se producen durante el proceso de irradiación. Aunque existen varios procedimientos que permiten detectar alimentos irradiados (como REE o la termoluminiscencia), se siguen demandando nuevas técnicas que posibiliten la detección cualitativa y cuantitativa del tratamiento de irradiación con mayor sensibilidad y simplicidad. En un trabajo previo (Capítulo IV), se demostró la viabilidad de la técnica de ^1H -RMN/HRMAS en el análisis no destructivo, rápido y directo de los compuestos minoritarios y mayoritarios presentes en el músculo del salmón ahumado intacto, sin necesidad de preparación previa. En base a estos resultados, en el presente trabajo se abordó el estudio del efecto conservador del tratamiento con electrones acelerados (radiación beta) en muestras de salmón (*Salmon salar*) ahumado en frío. El objetivo del trabajo fue evaluar el potencial del espectro de ^1H -RMN para estudiar los cambios en la composición de salmón ahumado irradiado (1 y 4 kGy) y no irradiado (0 kGy) durante el almacenamiento (hasta 30 días). Asimismo, se evaluó la posibilidad de poder discriminar entre muestras irradiadas y no irradiadas a través de un estudio metabólico que supone la aplicación de las técnicas quimiométricas a los datos espectroscópicos obtenidos.

La irradiación, incluso a la dosis más baja empleada (1 kGy), inhibió las vías de degradación de la muestra durante el almacenamiento (de 0 a 30 días). El procesamiento de los datos espectroscópicos en combinación con el análisis de

componentes principales y el análisis de la varianza permitió diferenciar entre muestras de salmón irradiadas y no irradiadas. Los principales metabolitos identificados, que mejor discriminaron entre ambas muestras fueron: creatina, óxido de trimetilamina y colina/fosfocolina. En conclusión, la ^1H -RMN/HRMAS, junto con el análisis estadístico, es una metodología eficaz para detectar muestras de salmón irradiadas y, en general, para evaluar el tiempo de almacenamiento y el efecto conservador del tratamiento con haces de electrones acelerados.



Trabajo 5

^1H -HRMAS NMR study of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) treated with E-beam

Magn. Reson. Chem. **2013**, 51, 350-357

Research Article

Received: 19 September 2012

Revised: 24 January 2013

Accepted: 25 March 2013

Published online in Wiley Online Library: 28 April 2013

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/mrc.3957

¹H-HRMAS NMR study of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) treated with E-beam

Palmira Villa,^a David Castejón,^a Marta Herraiz^b and Antonio Herrera^{a,c*}

¹H High resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopic data in combination with principal components analysis and analysis of variance were used to differentiate between irradiated and non-irradiated cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). NMR profiling was obtained, with a spectral acquisition time of less than 8 min, from a small sample size of intact white salmon muscle, by non-destructive analysis that includes a very simple and rapid sample preparation step. Results obtained enable the use of creatine, trimethylamine oxide and the sum of phosphorylcholine and glycerophosphorylcholine as diagnostic compounds to detect irradiation treatment. This study shows the potential of ¹H-HRMAS to be a rapid method for investigating compositional changes due to food processing as well as to confirm the presence or absence of some bioactive compounds in irradiated samples. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: NMR; ¹H-HRMAS; food irradiation; irradiation markers; food storage; metabolomic; cold-smoked salmon

Introduction

Among tools for increasing food safety, irradiation treatment is used to reduce foodborne infection. Irradiation is effective against most bacterial pathogens and parasites; as a consequence, it extends the shelf life of the product.^[1–4] Ionizing radiations applied in food processing include the following: (a) high-energy photons (gamma rays emitted from different radionuclides, mainly ⁶⁰Co and, to a lesser extent, ¹³⁷Cs); (b) X-rays resulting from the conversion, by machine sources with energies up to 5 MeV, of high-energy electrons to electromagnetic radiation; and (c) high-energy electron beams (E-beams), produced by accelerating machines with energies up to 10 MeV. E-beams, also called β -irradiation, have lower penetrability than gamma rays and X-rays, but in any case, the former process can be applied through packaging materials, so that possible risks of re-contamination or re-infestation can be precluded by performing the irradiation treatment after product packaging.^[5]

Generally speaking, differences in radiation sensitivities depend on different factors mainly related to the number of microorganisms present and the radioresistance of the particular species. Specifically, E-beam irradiation has proven to be quite effective in eliminating foodborne pathogens, such as *Lysteria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, and *Escherichia coli* O157:H7.^[6,7] As ionizing radiation causes effective disruption of DNA molecules in the nuclei of cells, the genetic material is damaged by the treatment, and hence, further growth of spoilage microorganisms is prevented.^[8–10]

A practical approach in the food science area must include consumer attitudes if irradiation is involved. Specific preferences (e.g., natural and safe foods containing beneficial bioactive compounds as well as satisfactory organoleptic attributes) must be born in mind. A technique to identify and quantify changes caused by irradiation of food is of intense interest.^[11–13]

Methods conventionally used to detect irradiated foods rely on physical, chemical, biological, and microbiological changes induced during the irradiation process. In this respect, although several methods based on diverse techniques are currently available

(e.g., ESR spectroscopy, thermoluminescence, chromatography, and comet assay), further improvements aimed at enhancing sensitivities and/or simplifying the overall procedure are also demanded.

High-resolution NMR spectroscopy has proven to be a versatile technique in elucidation studies for a wide variety of foods,^[14,15] including those whose lipid nature makes analysis of the food matrix difficult (e.g., in fish). An excellent overview of general trends in the application of NMR to fish processing and quality has recently been published.^[16] The heterogeneous distribution of tissues and the presence of lipids have been reported^[17–19] to cause broadening of conventional ¹H-NMR resonances in spectra of intact samples of salmon muscle. Salmon samples must be usually extracted prior to analysis by high resolution NMR.

When comparing ¹H-NMR and ¹³C-NMR experiments,^[20–23] it can be concluded that the former is less time consuming and provides higher sensitivities and thereby shorter acquisition times per experiment.

Even though most NMR applications employ high resolution ¹H and ¹³C, the use of magic angle spinning (MAS) NMR spectroscopy^[24–26] not only reduces line broadening and increases signal-to-noise ratios with accurate chemical shifts but also eliminates the conventionally used extraction step.

Concerning food irradiation, the World Health Organization, the Food and Agriculture Organization, and the International Atomic Energy Agency have a less restrictive legislative approach than that of the European Union. In this context, by the

* Correspondence to: Antonio Herrera, Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: aherrera@quim.ucm.es

a CAI de RMN y RSE, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

b Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC), c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

c Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Framework Directive published in 1999, the European Commission has already established an approximation of the laws of the member states regarding the use of ionizing radiation for foods and food ingredients.^[5] In any case, it is clear that regulations for irradiated foods require proper labeling that must be backed up with rapid and reliable analytical methods aimed at improving or simplifying existing procedures.^[11,27]

NMR has already demonstrated its usefulness in analyzing foods submitted to non-ionizing radiation (e.g., near ultraviolet, visible light, infrared, and microwave). However, the term *food irradiation* most frequently refers to ionizing radiations as the food is exposed to shorter waves, such as γ -rays, X-rays, or electron beams, to produce intense ionization and, consequently, changes in the largest molecules. In this respect, the application of ¹H-NMR spectroscopy to achieve the distinction of food treated with ionizing radiation and non-irradiated food has been so far mainly focused on the exposure to γ -rays,^[28–31] although the use of NMR to analyze vegetable matrices submitted to electron beam irradiation has also been reported.^[32]

In a previous work, we reported the feasibility of ¹H-HRMAS NMR in the non-destructive, rapid, and direct analysis of major and minor compounds present in intact salmon muscle.^[26] On the basis of the results so far obtained for non-irradiated samples, the present work expands the study to the effect of E-beam irradiation on cold-smoked Atlantic salmon. The aim of this work is to evaluate whether irradiation has a positive effect on the degradation of salmon samples during storage and to determine the necessary irradiation doses. According to this objective, we have studied samples under three different irradiation conditions (0, 1, and 4 kGy), which were stored at different times (0, 7, 15, and 30 days), and discussed if NMR together with chemometrics is able to differentiate between irradiated and non-irradiated samples.

Experimental

Samples

The cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) was acquired from a local market (three different batches of the same brand). Samples were irradiated at three different doses (0, 1, and 4 kGy) and stored each at 0, 7, 15, and 30 days. According to this, 12 different types of samples were studied in triplicate. A total number of 36 samples were analyzed. Samples were immediately sliced (2–3 mm thickness) with an electric machine whose contact surfaces were previously cleaned and washed with sterile distilled water. Slices (one per bag) were vacuum packaged to reach about 20 kPa in approximately 10 × 10 cm laminated film bags of low gas permeability (diffusion coefficient of 34 ml m⁻² day⁻¹ atm⁻¹ to O₂ and 147 ml m⁻² day⁻¹ atm⁻¹ to CO₂) and then transported under refrigeration in insulated polystyrene boxes and subsequently irradiated (IONMED sterilization SA, Tarancón, Cuenca, Spain) as described in the following. Irradiation was achieved by applying, at doses of either 1 or 4 kGy, a 10 MeV electron beam source. Irradiation was performed at room temperature (18–20 °C), and the product temperature increase during treatment was less than 2 °C. The dose absorbed was verified by measuring the absorption of cellulose triacetate dosimeters^[33] simultaneously irradiated with samples. Irradiated and non-irradiated samples were shipped and returned at 4 °C, and subsequently, the vacuum bags were also stored at 4 °C until analysis.

NMR experiments

The muscle of cold-smoked Atlantic salmon was examined using HRMAS. Portions of 3 mm by 3 mm were selected between the veining of the salmon muscle (within a myomere or myotomo without depot fat). A scalpel and a magnifying glass were used to remove the fat deposits from veining. The samples were introduced into a 50 μ L zirconium oxide rotor, with a cylindrical insert, together with 20 μ L of a 0.1 mM solution of sodium (3-trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate in D₂O (99.9 %) (both provided by Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The total time spent in preparing the sample was around 5 min. To remove the effects of spinning side bands from the acquired spectra, the rotor was spun at 4000 Hz, the lowest rate possible to minimize structural or chemical changes during analysis. Prior to the analysis, temperature calibrations were carried out using 100% methanol. The HRMAS probe was pre-cooled to 4 °C (Bruker Variable Temperature Unit, Germany) to minimize tissue degradation. Under such conditions, no noticeable degradation was observed during acquisition. 1D and 2D NMR analyses were carried out at 500.13 MHz using a Bruker AMX500 spectrometer operating at 11.7 T. We have repeated three times the acquisition of the first sample on each measuring session, and as expected, because of the excellent NMR reproducibility, no differences among spectra were observed.

Standard solvent suppressed spectra (NOESYPRESAT) were acquired into 16 k data points, averaged over 128 acquisitions. The total acquisition time was ~7 min, using a sequence based on the first increment of the NOESY pulse sequence to suppress water resonance and to limit the effect of B_0 and B_1 inhomogeneities in the spectra (relaxation delay-90°- t_1 -90°- t_m -90°-acquired free induction decay) in which a secondary radio frequency irradiation field is applied, at the water resonance frequency, during both the relaxation delay of 2 s and the mixing period (t_m = 150 ms), with t_1 fixed at 3 μ s and a spectral width of 8333.33 Hz.

TOPSPIN software, version 1.3 (Bruker Rheinstetten, Germany) was used to process all spectral data. Free induction decays were multiplied, prior to Fourier transformation, by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz, and the spectra were phased, baseline corrected, and referenced to sodium (3-trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate at δ = 0 ppm. 2D NMR data from COSY-HRMAS and TOCSY-HRMAS, measured on the salmon samples, were used to assist in assigning signals from ¹H-HRMAS NMR spectra. COSY-HRMAS experiment was acquired under the following conditions: water presaturation during 1 s relaxation delay, a spectral width of 8333 Hz in both dimensions, 2 k data points in f_2 , and 384 increments in f_1 . An unshifted sinusoidal window function was applied in both dimensions and zero filling in f_1 dimension. The TOCSY-HRMAS experiment was registered in TPPI phase sensitive mode, with water presaturation during 1 s relaxation delay, a spectral width of 8333 Hz in both dimensions, a 70 ms mixing time, 2 k data points in f_2 and, 384 increments in f_1 . To both experiments (COSY and TOCSY), zero filling in f_1 and unshifted squared sinusoidal window function in both dimensions were applied before Fourier transformation. Between consecutive 2D spectra, a control ¹H-NMR spectrum was measured. Analysis carried out in the same sample within 24 h did not show differences between ¹H-NMR experiments.

Statistical analysis

Principal components analysis (PCA) was applied to provide an unsupervised method of classification of NMR data. Data obtained from ¹H-NMR spectra were reduced using AMIX software

(version 3.9.7, Bruker Rheinstetten, Germany). Several regions and bucket widths were considered in the analysis. Specifically, the following regions of the ^1H -HRMAS spectra were subdivided into rectangular buckets of 0.04 ppm each: full spectrum recorded at 8.80–0.10 ppm (excluding the water region from 5.16 to 4.90 ppm), aromatic signals at 8.80–5.90 ppm, and amino acid region at 4.90–2.97 ppm. Additionally, variable buckets including only those signals from fatty acids (FAs) and triacylglycerides were also examined. Individual integral regions were normalized to the total sum of the integral region following exclusion of the water resonance. PCA was applied to the data matrix, and the loadings plots were then used to identify those buckets responsible for significant differences.

The buckets with the highest index of variability of p -level and F values were selected by the analysis of variance (ANOVA) using

MATLAB software (version 7.3 R2006; MathWorks Inc., Natick, MA, USA). A p -level of 0.05 (5% probability of error) was considered an acceptable error level, and the discrimination power of a specific variable was estimated by the F value (i.e., the ratio between-groups variability to within-group variability) so that the larger is F , the larger is the discrimination capacity.

Results and Discussion

^1H -HRMAS spectra

As stated previously, this work evaluates degradation of salmon samples during storage in relation to the level of irradiation applied. Figure 1(a, b) shows the whole 500 MHz ^1H -HRMAS

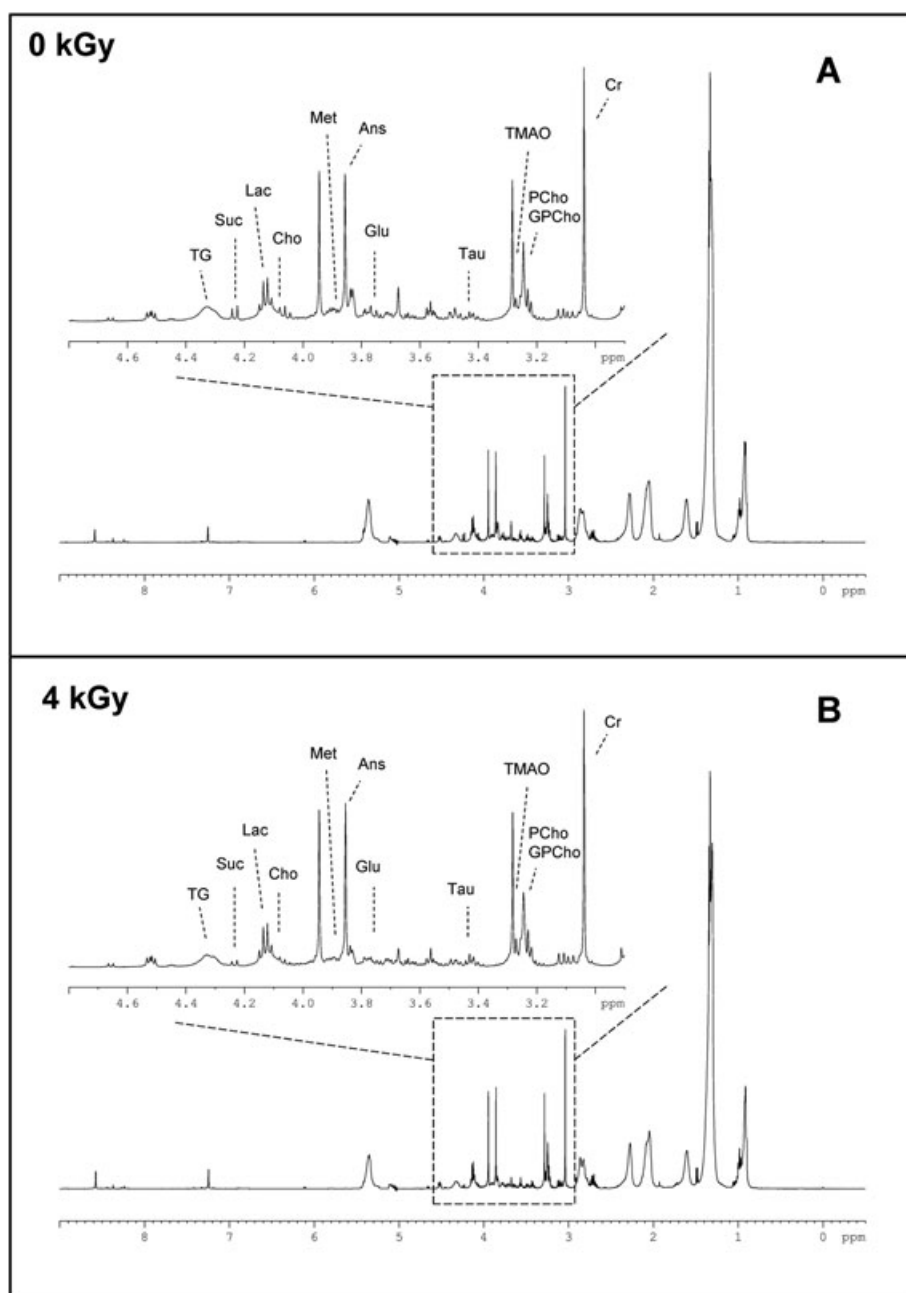


Figure 1. ^1H -HRMAS spectra obtained from cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) either (a) non-irradiated or (b) irradiated at 4 kGy. The signal scale has been expanded to show the small peaks in the region 3.05–4.80 ppm.

¹H-HRMAS analysis of irradiated salmon

spectra and the expanded amino acid region obtained from the cold-smoked salmon either non-irradiated (Fig. 1(a), sample labeled as 0 kGy) or irradiated at 4 kGy (Fig. 1(b)), respectively. The expanded region (4.80–3.05 ppm) shows the assignment of metabolites used further in the statistical analysis. Good resolution for the resulting signals was obtained in ¹H-HRMAS spectra from non-irradiated and irradiated samples. Homonuclear 2D correlation COSY and TOCSY-HRMAS experiments (Fig. 2) were also registered to ensure assignments from ¹H-HRMAS (main correlation signals are shown). In fact, our previous study of non-irradiated smoked Atlantic salmon showed that 1D and 2D HRMAS experiments could achieve full assignments of the data.^[26]

In all samples analyzed, ω -3 FAs, amino acids, carbohydrates, nucleoside derivatives, osmolytes, dipeptides, and organic acids, among others, were detected. Despite this, before the application of chemometric analysis of the results, a simple comparison between spectra resulting from non-irradiated (Fig. 1(a)) and

irradiated samples (Fig. 1(b)) did not allow the appreciation of significant differences.

First, degradation was checked by looking at some sensitive signals in the spectrum before further analysis of data was carried out. Figure 3(a, b) shows these regions at 8.42–8.10, 6.20–6.00, 5.50–5.15, and 4.90–4.00 ppm of water-suppressed ¹H-HRMAS spectra acquired at different storage times. For the sake of comparison, Fig. 3(a) presents previous results^[26] of ¹H spectra recorded from non-irradiated samples to different storage times (0, 7, 15, and 30 days), whereas Fig. 3(b) shows the spectra obtained from samples irradiated at the lowest dose (1 kGy) used at the same times of storage. The evaluation of Fig. 3(a, b) shows that no degradation in irradiated samples was observed after storage, as the presence of the signals of carbohydrates (5.42, 4.65, and 4.23 ppm) and different adenosine triphosphate degradation products (8.24, 8.21, and 8.19 ppm) indicates in Fig. 3(b).

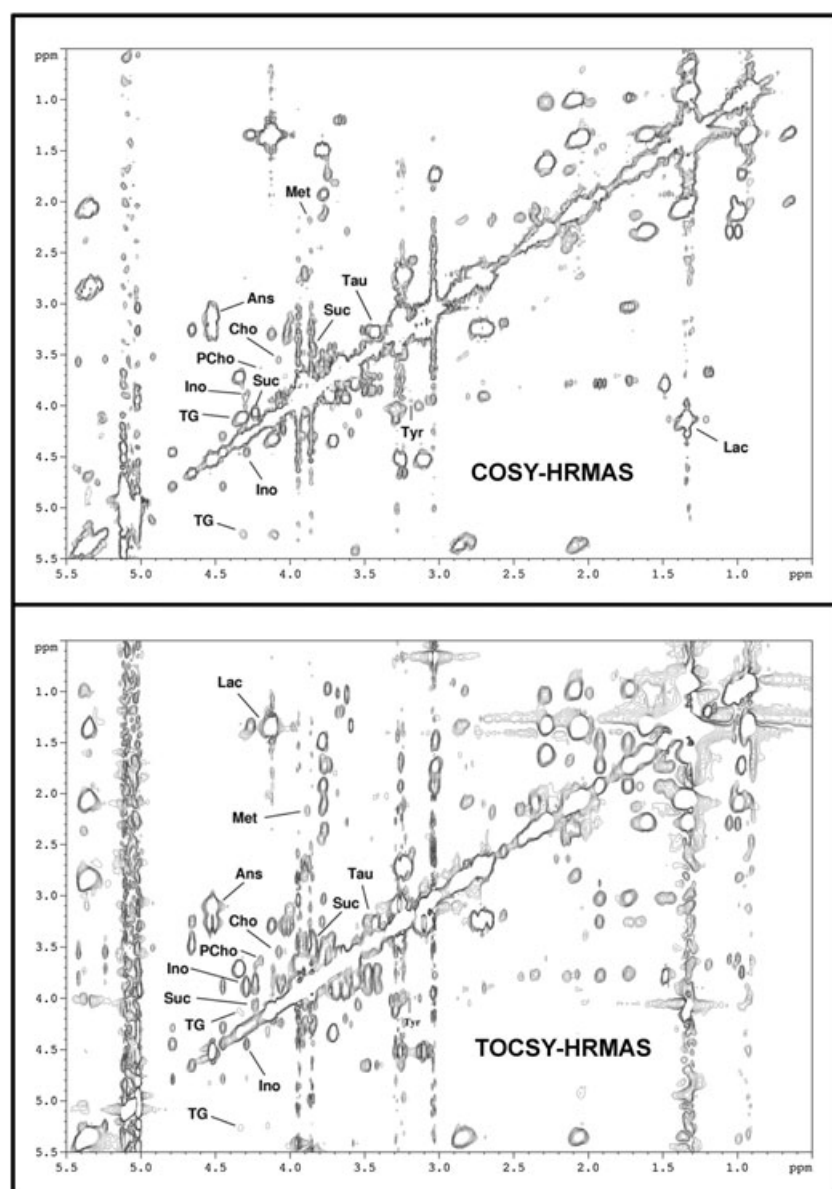


Figure 2. COSY and TOCSY-HRMAS spectra obtained from non-irradiated cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and main correlation signals used in assignments.

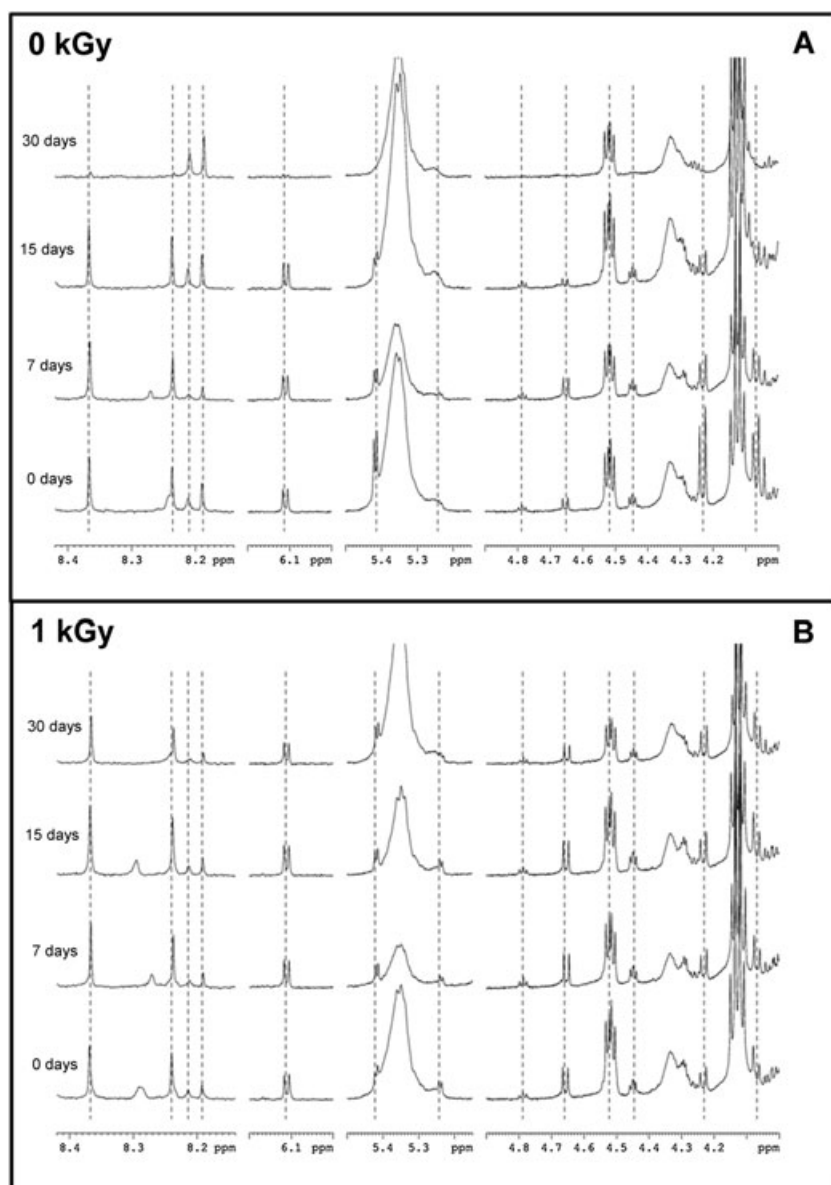


Figure 3. Expanded regions at 8.42–8.10, 6.20–6.00, 5.50–5.15, and 4.90–4.00 ppm of water-suppressed ^1H -HRMAS spectra from (a) non-irradiated and (b) irradiated (1 kGy) samples of white muscle from cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored at different times ranging from 0 to 30 days.

Samples irradiated at both 1 and 4 kGy exhibited the same behavior against degradation. The study shows that irradiation, even at a dose as low as 1 kGy, inhibits the sample degradation, also lengthening the shelf life of the product.

As mentioned before, the initial comparison of the spectra did not reveal significant differences between non-irradiated (Fig. 1(a)) and irradiated samples (Fig. 1(b)). Moreover, the presence of new compounds or by-products that may have been expected from auto-oxidation reactions, resulting from the irradiation process,^[34,35] could not be confirmed from ^1H -HRMAS spectra taken from irradiated samples.

Actually, it was expected that the redundancy in the NMR data made structure elucidation difficult. Although those compounds containing only one type of proton give a unique peak signal, it is also true that most biochemical components have different proton types and, consequently, various peaks can be ultimately scattered along the complete spectrum. Furthermore, most of the information contained in the spectrum is common to all

samples of Atlantic cold-smoked salmon white muscle. These are reasons that make it difficult to select a diagnostic compound that distinguishes irradiated samples from non-irradiated ones. In this respect, it is interesting to point out that we did not aim to identify as many compounds as possible, but to differentiate between irradiated and non-irradiated samples using NMR together with statistical analysis, with a view to find those compounds that by themselves could be used as markers of irradiation treatment.

Variability of data

To select the data that distinguish between irradiated and non-irradiated cold-smoked salmon samples from the vast amount of data, we applied an unsupervised method of classification requiring no training set of data. Specifically, a PCA was applied to reduce the dimensionality of the data matrix in such a way that the original variables (i.e., NMR signals in this particular case)

¹H-HRMAS analysis of irradiated salmon

could be transformed into a smaller number of new latent variables, called principal components (PCs), which are uncorrelated to each other. Thus, the PCs obtained from our NMR data gave us the weight (loading) corresponding to the influence of each particular variable on the overall distribution of samples. The examined sections are reported in the Experimental section.

Irradiation markers

The best differentiation between non-irradiated and irradiated samples was found in the amino acid region where the PC1 accounts for 89.47% of the variability within the data. Complementary ANOVA of the PC1 data is shown in Fig. 4, which displays the box plots corresponding to the distribution of PC1 for non-irradiated samples (0 kGy) and irradiated samples at either 1 or 4 kGy. Specifically, the ratio between-groups variability to within-group variability (i.e., the *F* value) were as high as 17.67, demonstrating a satisfactory discrimination power of the corresponding variable. Moreover, the *p*-value observed for this case, 0.0031, means that the probability of error involved is 0.31%, indicating a highly reliable variable parameter.

From the loading values of the variables associated with the first (PC1) and second (PC2) PCs reported in Fig. 5, we could establish the buckets (and their corresponding variables) that have the highest contribution to PC1 (i.e., the PC that best discriminates between irradiated and non-irradiated samples). The buckets are listed in Table 1 with their corresponding ¹H-HRMAS signal assignments along with the ANOVA-generated *F* values and *p*-levels. The entries in bold all have *p*-levels lower than 0.05, indicating an acceptable error (<5%) for a significant difference between two groups. Thus, the integrals for the signals corresponding to the following metabolites were significantly different between irradiated and non-irradiated samples: creatine (Cr, 3.04 and 3.96 ppm), sum of phosphorylcholine and glycerophosphorylcholine (PCho/GPCho, 3.24 ppm), trimethylamine oxide (TMAO, 3.28 ppm), taurine (Tau, 3.40 and 3.44 ppm), choline (Cho, 4.08 ppm), lactic acid (Lac, 4.12 ppm), sucrose (Suc, 4.24 ppm), inosine (Ino, 4.28 ppm), triglycerides (4.32 and 4.36 ppm), and anserine (Ans, 4.52 ppm). As mentioned earlier, homonuclear 2D correlation COSY and TOCSY-HRMAS experiments (Fig. 2) were carried out to ensure

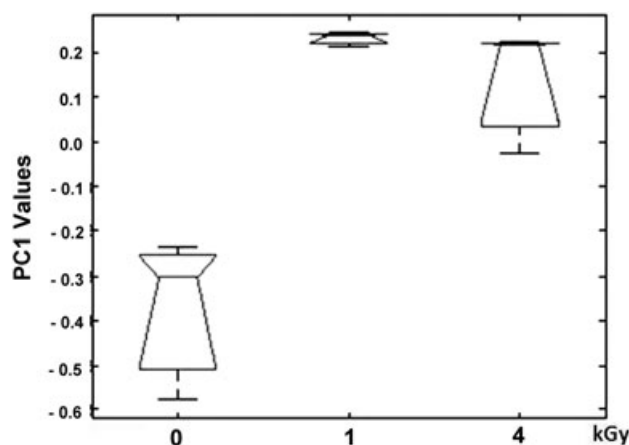


Figure 4. Box plots for PC1 resulting from samples left non-irradiated (0 kGy) and irradiated at either 1 or 4 kGy.

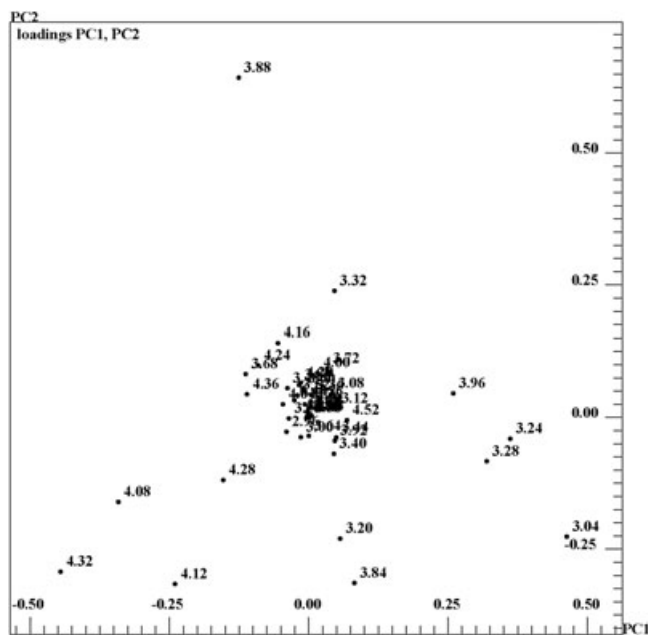


Figure 5. PCA loadings plot (PC1 vs PC2) based on salmon ¹H-HRMAS NMR spectra (see text for further details).

Table 1. Signal assignments for ¹H-HRMAS NMR spectrum from white muscle of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*), *F* values, and *p*-levels resulting from ANOVA applied to selected metabolites

Metabolites	Bucket ^a (ppm)	<i>F</i>	<i>p</i> -level
Creatine	3.04	16.2	0.0038
NI or tyrosine or choline	3.20	1.53	0.2905
Phosphorylcholine/ glycerophosphorylcholine	3.24	16.84	0.0035
Trimethylamine oxide	3.28	18.58	0.0027
NI	3.32	1.44	0.3094
Taurine	3.40	5.57	0.0429
Taurine	3.44	5.59	0.0425
NI	3.68	16.37	0.0037
Anserine and/or sucrose	3.84	0.52	0.6173
Methionine and/or inosine	3.88	1.02	0.4148
NI	3.92	0.83	0.4811
Creatine	3.96	17.44	0.0032
Choline	4.08	12.64	0.0071
Lactic acid	4.12	10.28	0.0115
Phosphorylcholine	4.16	2.08	0.2060
Sucrose	4.24	12.06	0.0079
Inosine	4.28	0.42	0.0181
Triglycerides	4.32	12.48	0.0073
Triglycerides	4.36	5.67	0.0415
Anserine	4.52	23.35	0.0015

Variables with *p*-level <0.05 (5% probability of error) are given in bold type.

NI, not identified.

^aMiddle point of the bucket. Because of the bucket's width (Δ = 0.04 ppm), more than one peak can be included.

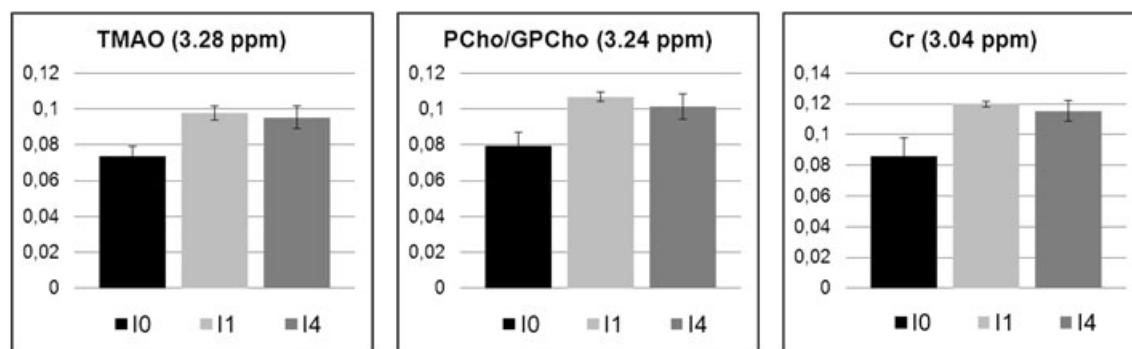


Figure 6. Histograms relative to the intensities (arbitrary units) of selected metabolites (TMAO, PCho/GPCho, and Cr) including mean values and standard errors obtained for samples non-irradiated (I0) and irradiated at either 1 (I1) or 4 kGy (I4).

assignments from ^1H -HRMAS, as for example, by signals from Tau (correlation 3.26/3.42 ppm), Met (3.88/3.17), and Ino (4.45/4.29).

From Table 1, it can be seen that even higher confidence (and the best differentiation) can be given to the signals having p -levels corresponding to $<0.5\%$ error, namely, 3.04 ppm (Cr), 3.24 ppm (PCho/GpCho), 3.28 ppm (TMAO), 3.68 ppm (unidentified metabolite), and 4.52 ppm (Ans). It is important to note that the Cr, PCho/GPCho, and TMAO characteristic signals correspond to the same chemical group (i.e., a methyl attached to nitrogen). This fact suggests that the signal from this functional group is more sensitive to the irradiation process. The remaining ^1H signals, which are significant, according to the statistical analysis, are attached to an electronegative atom. In this regard, the following signals have been assigned to the groups specified in each case: Tau (3.44 ppm) and Met (3.88 ppm) to an alpha $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ group; Ino (3.88, 4.28 ppm), Cho (4.08 ppm), and Lac (4.12 ppm) to an alpha CH-OH group; Ans (3.84 ppm) to a $\text{CH}_3\text{-N}$; and PCho (4.16 ppm) to an alpha CH_2 phosphoryl group. Additionally, the signals observed at 4.32 and 4.36 ppm correspond to positions $sn1,3$ of a triglyceride and thus belong to a CH_2 attached to a carboxyl FA group. It is interesting to point out that although Cho possesses a $\text{CH}_3\text{-N}$ group (3.21 ppm), its corresponding p -level and F values do not suggest that it is a discriminant variable. On the contrary, the Cho signal from CH_2 attached to an OH group (4.08 ppm) provided discrimination between the investigated groups of samples (Table 1). According to these results, it can be stated that irradiated and non-irradiated samples can be differentiated on the basis of irradiation effects observed on the metabolites mentioned earlier rather than of those modifications, previously reported by other authors,^[8,27,34,35] resulting from fatty acids exposed to high-energy radiation.

Figure 6 collects the histograms relative to the intensities of the three selected signals (Cr, PCho/GPCho, and TMAO) including their mean values and standard errors obtained for non-irradiated (0 kGy) and irradiated samples (1 and 4 kGy). Apparently Cr, PCho/GPCho, and TMAO are more abundant in irradiated samples although their levels do not vary appreciably with the irradiation dose. Consequently, the ANOVA and PCA results agree in selecting discriminating variables between the irradiated and non-irradiated samples.

Conclusions

To summarize, this paper reports on the feasibility of ^1H -HRMAS NMR, together with statistical analysis, to detect irradiated salmon samples and, more generally, to evaluate compositional changes due to processing or storage conditions. Irradiation,

even at doses as low as 1 kGy, prevents sample degradation during storage times varying from 0 to 30 days.

The small sample size and the short time required for the complete experimental run (approximately 5 min for sample preparation plus 7 min for spectral acquisition) qualifies the procedure as a rapid screen for irradiation treatment. The principal metabolites identified for best discrimination between irradiated and non-irradiated samples are Cr, TMAO, and PCho/GPCho.

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Science and Technology Commission, Project Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00016-03), and the Comunidad de Madrid (Project CM S-0505/AGR-0314) is gratefully acknowledged. The authors also thank CAI de RMN y RSE de la UCM for measurements of NMR spectra.

References

- [1] WHO, Wholesomeness of irradiated food. World Health Organization. *Technical Report Series 659*. Report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Geneva, **1981**.
- [2] WHO, Safety and Nutritional Adequacy of Irradiated Food, World Health Organization, Geneva, **1994**.
- [3] WHO, High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. World Health Organisation. *Technical Report Series 890*. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Study Group. Geneva, **1999**.
- [4] M. T. Osterholm, A. P. Norgan. *New Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1898–1901.
- [5] J. Farkas. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 148–152.
- [6] G. Blank, K. Shamsuzzaman, S. Sohal. *J. Dairy Sci.* **1992**, *75*, 13–18.
- [7] M. C. Cabeza, I. Cambero, L. de la Hoz, J. A. Ordóñez. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2007**, *8*, 299–305.
- [8] M. Grootveld, R. Jain, A. W. D. Claxson, D. Naughton, D. R. Blake. *Trends Food Sci. Tech.* **1990**, *1*, 7–14.
- [9] J. F. Diehl, *Safety of Irradiated Foods*, 2nd edn, Marcel Dekker, Inc., New York, **1995**.
- [10] A. Khan, M. Abraham. *Int. Food Res. J.* **2010**, *17*, 825–836.
- [11] J. F. Diehl. *Radiat. Phys. Chem.* **2002**, *63*, 211–215.
- [12] A. G. Chmielewski, M. Haji-Saeid. *Radiat. Phys. Chem.* **2004**, *71*, 16–20.
- [13] C. H. Sommers, F. Fan (Eds), *Food Irradiation Research and Technology*, IFT Press, Blackwell, Ames, IA, **2006**.
- [14] G. A. Webb (Ed), *Modern Magnetic Resonance*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, **2006**.
- [15] I. Martinez, M. Aursand, U. Erikson, T. E. Singstad, E. Veliyulin, C. van der Zwaag. *Trends Food Sci. Tech.* **2003**, *14*, 489–498.
- [16] U. Erikson, I. B. Standal, I. G. Aursand, E. Veliyulin, M. Aursand. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, 471–480.
- [17] I. S. Gribbestad, M. Aursand, I. Martinez. *Aquaculture* **2005**, *250*, 445–457.
- [18] M. Aursand, F. Mabon, G. J. Martin. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, S91–S100.
- [19] M. Aursand, F. Mabon, G. J. Martin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 659–666.

¹H-HRMAS analysis of irradiated salmon

- [20] M. Aursand, J. R. Rainuzzo, H. Grasdalen. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, 70, 971–981.
- [21] M. Aursand, L. Jorgensen, H. Grasdalen. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, 72, 293–297.
- [22] M. Aursand, I. B. Standal, A. Praël, L. McEvoy, J. Irvine, D. E. Axelson. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 3444–3451.
- [23] I. Martínez, I. B. Standal, D. E. Axelson, B. Finstad, M. Aursand. *Food Chem.* **2009**, 116, 766–773.
- [24] Q. W. Ni, T. M. Eads. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 1026–1034.
- [25] M. Aursand, I. S. Gribbestad, I. Martinez, in *Modern Magnetic Resonance* (Ed: G. A. Webb), Springer, Dordrecht, The Netherlands, **2006**.
- [26] D. Castejón, P. Villa, M. M. Calvo, G. Santa-María, M. Herraiz, A. Herrera. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48, 693–703.
- [27] H. Delincée. *Radiat. Phys. Chem.* **2002**, 63, 455–458.
- [28] M. Adamo, D. Capitani, L. Mannina, M. Cristinzio, P. Ragni, A. Tata, R. Coppola. *Radiat. Phys. Chem.* **2004**, 71, 165–168.
- [29] R. Stefanova, S. Toshkov, N. V. Vasilev, N. G. Vassilev, I. N. Marekov. *Food Chem.* **2011**, 127, 461–466.
- [30] P. Zoumpoulakis, V. J. Sinanoglou, A. Batrinou, I. F. Strati, S. Miniadis-Meimaroglou, K. Sflomos. *Food Chem.* **2012**, 131, 713–721.
- [31] E. Zanardi, A. Caligiani, E. Padovani, M. Mariani, S. Ghidini, G. Palla, A. Ianeri. *Meat Sci.* **2013**, 93, 171–177.
- [32] J. M. Ribó, J. Crusats, Z. El-Hachemi, M. Feliz, P. Sanchez-Bel, F. Romojaro, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2004**, 81, 1029–1033.
- [33] ASTM: American Society for Testing and Materials, E1650-97e1 Standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems, Vol. 12.02, **2000**.
- [34] P. R. LeTellier, W. W. Nawar. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, 20, 129–134.
- [35] W. W. Nawar. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 21–25.



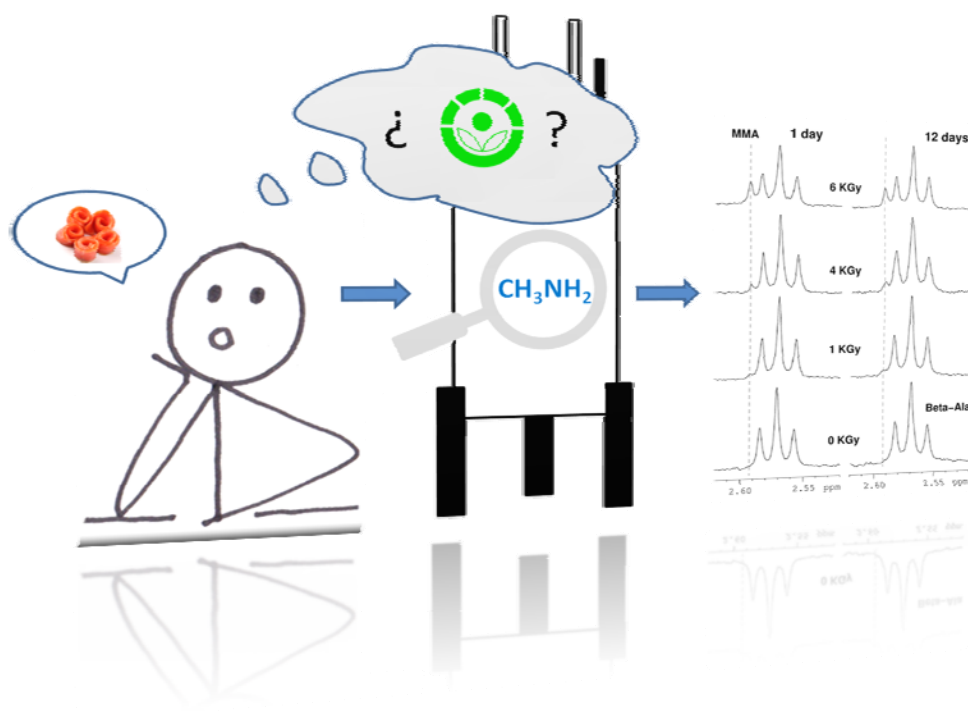
III.2.1.3: POTENCIAL DE LOS DERIVADOS DE LA METILAMINA COMO INDICADORES DEL TRATAMIENTO DE IRRADIACIÓN EN SALMÓN (*SALMON SALAR*).

III.2.1.3: POTENCIAL DE LOS DERIVADOS DE LA METILAMINA COMO INDICADORES DEL TRATAMIENTO DE IRRADIACIÓN EN SALMÓN (*SALMON SALAR*).

En los trabajos previos (4 y 5) se comprobó la viabilidad de la ^1H -RMN/HRMAS en el análisis no destructivo, rápido y directo de los componentes del salmón (*Salmon salar*) ahumado en frío y para estudiar el efecto conservador de los tratamientos de irradiación desde 1 kGy. También se constató la posibilidad de discernir entre muestras irradiadas y no irradiadas a través de un estudio metabólico basado en los derivados de metilamina formados. El estudio anterior (trabajo 5), se circunscribió a la región espectral de 3.02 - 4.80 ppm para evitar el solapamiento con las señales anchas e intensas de los ácidos grasos. La heterogénea distribución de la grasa en el músculo del salmón así como las diferencias en el grado de engrasamiento de los animales, confirieron a la señales de los ácidos grasos gran variabilidad, incluso utilizando una secuencia CPMG para la adquisición de los espectros de ^1H -RMN. Para intentar solventar este serio problema y poder estudiar el espectro completo, se buscaron nuevas matrices de análisis que permitieran realizar el estudio con la menor manipulación posible, sin recurrir a procedimientos de extracción. En esta línea se planteó el presente trabajo (6) en el que se utilizó el exudado liberado por el salmón fresco envasado durante su almacenamiento. Se trata de la primera experiencia en la que se recurre al análisis de esta matriz fundamentalmente hidrofílica con un reducido contenido lipídico y que por tanto permitiría el estudio del espectro de ^1H -RMN completo. Por otra parte, al tratarse de una muestra homogénea, solventa los problemas asociados a la toma de muestra (deterioro de las piezas, y la posible falta de uniformidad).

Los datos espectrales obtenidos a partir de las muestras de exudado se comparan con los procedentes de las muestras de músculo de salmón. El análisis de los espectros de ^1H -RMN de ambas matrices (exudado y músculo) permitió demostrar que la información metabólica era la misma (datos no incluidos en la tesis) y era igualmente posible la monitorización de la evolución de las muestras durante su almacenamiento. Tras comprobar la validez del exudado como matriz de análisis representativa de los procesos ocurridos en el músculo, se estudió el efecto de los tratamientos de irradiación con el objetivo de hallar marcadores de irradiación en las muestras de exudado. Para ello, se trataron muestras de salmón fresco con electrones acelerados y se recogieron

los exudados liberados a distintos tiempos de almacenamiento (4 °C). Las muestras fueron liofilizadas y redisueltas en D₂O para su análisis mediante ¹H-RMN de líquidos. Los resultados obtenidos se contrastaron con los de los derivados del análisis de músculo fresco y de salmón ahumado. Como marcadores de los cambios producidos se utilizaron las señales de los derivados de metilamina, algunas de las cuales se encuentran en regiones espectrales excluidas en el análisis del músculo mediante HRMAS. Los contenidos de las tres principales metilaminas identificadas en los espectros, [*N*-óxido de trimetilamina (OTMA), trimetilamina (TMA) y monometilamina (MMA)], mostraron diferencias significativas entre las muestras no irradiadas y las irradiadas. La MMA estuvo presente en todas las muestras (exudado y músculo; fresco y ahumado) irradiadas y ausente en las no irradiadas. Además, la intensidad de la señal de la MMA correlacionó significativamente con la dosis de irradiación aplicada y fue independiente del tiempo de almacenamiento. Por todo ello, se propone a la MMA como un indicador adecuado de irradiación en muestras de salmón, tanto fresco como ahumado.



Trabajo 6

“Effect of E-beam treatment on the methylamine compounds in Atlantic Salmon”

Food control **2016**, 60, 455-460

Parte de este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en el “3rd Kiel Food Science Symposium” celebrado en Kiel (Alemania) en mayo de 2014.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Short communication

NMR-detection of methylamine compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to E-beam irradiationD. Castejón^a, J.M. García-Segura^{a,b}, A. Herrera^c, M.I. Cambero^{d,*}^a Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain^c Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain^d Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2015

Received in revised form

30 July 2015

Accepted 12 August 2015

Available online 15 August 2015

Keywords:

Salmon

Irradiation

E-beam

NMR

Exudate

Monomethylamine

ABSTRACT

Exudates and muscles from Atlantic salmon samples, subjected to different E-beam irradiation treatments, have been employed to monitor, through ¹H NMR analysis, the effects of irradiation dose and storage time on methylamine compounds. The three methylamines identified in the spectra, [trimethylamine N-oxide (TMAO), trimethylamine (TMA) and monomethylamine (MMA)], showed significant differences between non-irradiated and irradiated samples. MMA was present in all irradiated samples, and absent from non-irradiated ones. Furthermore, MMA signal intensity was well correlated with the irradiation dose applied and was stable during storage time. Therefore, MMA could be an effective indicator of irradiation in samples of salmon.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Salmon, belonging to the family Salmonidae, is an economically important fish in contemporary daily life (Carlson & Hites, 2005). Raw salmon is commonly served as a delicacy, which requires good storage in order to keep it fresh and safe for consumption (Zhou & Ackman, 2003). Irradiation has been proposed to extend the chilled shelf life and ensure the hygienic quality of fishery products by reducing the microbial population (Licciardello & Ronsivalli, 1982; Mendes, Silva, Nunes, & Empis, 2005; Venugopal, Doke, & Thomas, 1999). However, this process could bring about changes in food components, and subsequently alterations in aroma, color and flavor which might significantly affect consumer acceptance. The quality of irradiated food varies considerably depending on the

type of product, the process conditions and the packaging type (Medina et al., 2009; Montiel et al., 2013).

Special conditions, such as low temperature or an oxygen-free atmosphere, are recommended for irradiation treatment of some food products to increase its preservative effect and to reduce its impact on the nutritional quality and sensory characteristics of food (Thayer, Fox, & Lakritz, 1993; WHO & FAO, 1988). In this way, the combination of irradiation, vacuum packaging and storage under refrigeration (4 °C) is a common practice when applying irradiation to fish (Arvanitoyannis, Stratakos, & Mente, 2008). In previous work, we have reported that E-beam treatment is an effective method for sanitizing different vacuum packaged products with negligible sensory changes (Cambero et al., 2012; García-Márquez, Cambero, Ordóñez, & Cabeza, 2012; Herrero, Carmona, Ordóñez, de la Hoz, & Cambero, 2009; Medina et al., 2009; Montiel et al., 2013) and consequently this treatment might result very useful from a commercial point of view. Moreover, an increase of shelf life has been reported by several authors for irradiated vacuum packaged raw fish (Arvanitoyannis et al., 2008; Chouliara, Savva, Panagiotakis, & Kontominas, 2004; Kasimoglu, Denli, & Ic, 2003).

Abbreviations: NMR, nuclear magnetic resonance; TMAO, trimethylamine N-oxide; TMA, trimethylamine; DMA, dimethylamine; MMA, monomethylamine; FA, formaldehyde; HRMAS, high resolution magic angle spinning; FID, free induction decay.

* Corresponding author.

E-mail address: icambero@vet.ucm.es (M.I. Cambero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.015>

0956-7135/© 2015 Published by Elsevier Ltd.

In recent years, the volume and number of irradiated food products introduced in the market have grown steadily. As a result, consumers and legislative authorities demand clear labeling of irradiated foods (Morehouse & Komolprasert, 2004). The development of analytical methods to correctly distinguish irradiated samples from non-irradiated ones has thus become important to uphold regulatory controls. Regulatory authorities in all countries are, therefore, interested in having reliable methods to detect irradiated foods and estimate irradiation dose (Chauhan, Kumar, Nadasanabapathy, & Bawa, 2009).

Detection of methylamines has a great relevance in food analysis, in view of their importance as indicators of fish spoilage (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). Trimethylamine oxide (TMAO) constitutes a characteristic and important part of the non-protein nitrogen fraction in marine species, which is responsible for osmoregulation in fish and is interesting as a freshness indicator (Chung & Chan, 2009). During bacterial spoilage of fish, TMAO is reduced to trimethylamine (TMA) (Huss, 1995) and is demethylated to equimolar formaldehyde (FA) and dimethylamine (DMA) by catalysis with the endogenous enzyme, trimethylamine oxide aldolase (TMAOase) (Chung & Chan, 2009). TMAO, TMA and DMA are usually accompanied by small amounts of monomethylamine (MMA) which is a product of amine metabolism (Mark et al., 2011).

We have previously reported that TMAO and TMA can be identified by High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance (HRMAS-NMR) in whole smoked salmon (Castejón et al., 2010), thus allowing their metabolism to be monitored over storage (vacuum packaged samples stored at 4 °C). Furthermore, Villa, Castejón, Herraiz, and Herrera (2013) evaluated the effect of irradiation on the degradation of salmon samples under these storage conditions, concluding that methylamine compounds could be of use to discriminate between irradiated and non-irradiated samples.

The aim of the present study is to evaluate if the methylamine compounds could be used as irradiation indicators. ¹H NMR spectra of salmon exudates are used to analyze the methylamine derivatives and to evaluate how they are affected by E-beam treatment and storage. The aqueous nature of exudates, first used in NMR analysis of fish, should reduce signals of fatty acids, thereby improving the detectability of methylamines in ¹H NMR spectra. In order to compare the results obtained in the exudate samples in different ways of commercialization, muscle samples from fresh and cold-smoked salmon were directly analyzed by HRMAS NMR.

2. Materials and methods

2.1. Analysis of fresh salmon Atlantic salmon (*Salmo salar*)

2.1.1. Samples preparation

Anterior-dorsal muscle samples from raw Atlantic salmon (*S. salar*) were collected from two local fish markets. Salmon samples were bought three days after capture and were kept on ice under refrigeration (0–1 °C). Thermally insulated containers were employed during transportation of the samples to the laboratory, which, in all cases, took no longer than 1 h. Afterward, 50 g pieces of salmon samples were vacuum-packed at 20 kPa in 10 × 10 cm laminated film bags (90 µm copolymer of polyamide/polyethylene) of low gas permeability (transmission rates of 35 cm³ 24 h⁻¹ m⁻² bar⁻¹ and 150 cm³ 24 h⁻¹ m⁻² bar⁻¹ for O₂ and CO₂, respectively) and stored anaerobically at 4 ± 1 °C until irradiation treatment, which were performed over the next 12–14 h.

2.1.2. Irradiation treatment

Seventy-two samples (6 salmon × 4 doses × 3 storage times) were transported under refrigeration (4 ± 1 °C) in insulated boxes

to the irradiation plant (Ionmed S.A., Tarancón, Cuenca, Spain), and treated under an electron-beam (E-beam) radiation source operating at 10 MeV. The radiation treatment was adjusted to apply doses of 1, 2 and 6 kGy. The doses applied were lower than 10 kGy, which are considered safe by the World Health Organization (WHO, 1999). The dose absorbed by the samples was checked by determining the absorbance of cellulose triacetate dosimeters (ASTM, 2000) irradiated simultaneously. Non-treated samples (0 kGy) were used as control. After irradiation treatment samples were stored at 4 ± 1 °C.

2.1.3. Muscle and exudates collection

At 1, 6 and 12 days of storage, released exudates were collected from the vacuum-packed samples (one for each animal and applied doses), frozen at –80 °C, and freeze-dried at room temperature. The freeze-dried exudates were stored at –80 °C until NMR analysis.

Six representative salmon samples (0 and 6 kGy), after collecting their exudates, were frozen at –80 °C until NMR analysis.

2.1.4. Preparation of samples for NMR analysis

For ¹H NMR analysis 18.1 ± 0.3 mg of the lyophilized Atlantic salmon exudates were reconstituted in an eppendorf by adding 650 µL phosphate buffer solution in D₂O (0.1 M; pH = 7.0) containing 1 mM sodium trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP), as an internal chemical shift standard. Samples were vortexed for 30 s and transferred to 5 mm NMR tube. The pH of samples, measured after the NMR experiment was 6.98 ± 0.03, which allowed volatilization of TMA and other amines at high pH values to be ruled out (Huss, 1995).

For ¹H HRMAS-NMR analysis ~10 mg of tissue were examined. The samples were placed in a 50 µL zirconium oxide rotor with a cylindrical insert, together with 40 µL of 1 mM solution of TSP.

2.1.5. NMR analysis

¹H NMR spectra were recorded randomly at 277 K in a Bruker AMX-500 MHz spectrometer using a reverse detection probe (exudates) and a HRMAS probe (muscles) (BrukerBio-spin GmbH, Rheinstetten, Germany).

¹H NMR spectra of exudates were routinely recorded using the pulse sequences: 1D NOESY (NOESYPRESAT) and CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill), both with water suppression. A mixing time of 150 ms was used for the former, and an echo time of 50 ms was selected for the latter. Both 1D NMR experiments were acquired with 32k time domain data points, 18 ppm spectral width, 64 scans, and 2 s of relaxation delay. With a view to peak integration CPMG registers were finally selected because of their better performance in terms of attenuation of broad signals from proteins and lipoproteins, thus making it easy to correct spectral baseline. ¹H-HRMAS-NMR spectra of muscles were performed at 4000 Hz spinning rate. Standard solvent suppressed spectra (NOESYPRESAT) were acquired into 16k data points, averaged over 128 acquisitions. The total acquisition time was ~7 min, with a relaxation delay of 2 s, a mixing time of 150 ms and a spectral width of 18 ppm.

The free induction decays (FIDs) obtained were processed with Bruker Biospin TOPSPIN software (version 2.1) as follows: exponential filtering (LB = 1 Hz), Fourier Transformation (FT), spectral phasing and baseline correction. Spectra were referenced to TSP signal at δ = 0 ppm.

2.2. Analysis of cold-smoked Atlantic salmon (*S. salar*)

The study included reprocessing of all cold-smoked salmon NMR spectral data evaluated by Villa et al. (2013) corresponding to samples which had been irradiated at 0, 1, and 4 kGy and stored at

4 °C during 0, 7, 15, and 30 days. In our present work has been also included samples treated with E-beam irradiation at 8 KGy. Overall, 42 spectral data were analyzed.

2.3. Spectral assignment

Assignment of the resonance signals in the ^1H NMR spectra from salmon was based on previous study (Castejón et al., 2010) and on the databases: HMDB (Human Metabolite Data Base <http://www.hmdb.ca/>) and Chenomx (NMR Suite version 7.6, Edmonton, Canada). Identification of the MMA signal was confirmed through heteronuclear correlation in the ^1H – ^{13}C HSQC spectrum and by spiking the exudate sample with pure MMA standard (see [supplementary material](#)).

2.4. Statistical analysis

One-way ANOVA analysis and Duncan's test for multiple mean comparisons were performed to ascertain differences among means. Statistical analysis was carried out using a Statgraphics Plus version 5.0. Data were presented as the means and the standard deviations (SD) of each radiation treatment and storage time.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of salmon exudate

As expected from the aqueous nature of the exudates, the main differences between a sample of fresh salmon (muscle) and its exudate spectra lie in the signals of fatty acids (Fig. S1). They were the major compounds in muscle samples but minor metabolites in

exudates spectra. This fact allowed us to focus on signals present in the spectral region between 0.8 and 3.0 ppm.

Fig. 1 includes enlargements of the ^1H NMR exudate spectra, with and without irradiation, at different storage times (1, 6 and 12 days). The same storage processes described by Castejón et al. (2010) in cold-smoked muscle can be monitored in the exudates. Furthermore, the arrest of the degradation processes after irradiation, already seen in a previous study on cold-smoked salmon (Villa et al., 2013), was evidenced in salmon exudates as well.

3.2. Effect of E-beam treatment and storage on methylamines

As mentioned above, TMAO degradation may be associated with bacterial action, resulting in the appearance of TMA, and/or with enzymatic action that decomposes TMAO in DMA and FA (Huss, 1995). In all samples analyzed (fresh and cold-smoked salmon) the singlets of TMAO (3.28 ppm) and TMA (2.91 ppm) were identified while the DMA singlet (2.71 ppm) was not recognized. It is known that freezing induces the appearance of DMA (Huss, 1995). This fact has been confirmed by NMR studies of cod and mullet (Martinez et al., 2005; Piras, Scano, Locci, Sanna, & Marincola, 2014). On the other hand, none of the previous studies that analyzed unfrozen fish identified DMA by NMR (Castejón et al., 2010; Mannina et al., 2008; Schock, Newton, Brenkert, Leffler, & Bearden, 2012).

MMA, the simplest aliphatic amine, was identified in some of our exudate samples (none described in previous NMR studies on fish). MMA appears as a singlet at 2.60 ppm in the ^1H spectra, this assignment was confirmed by adding a standard solution of MMA directly to the exudate sample (Fig. S2) and by performing a two-dimensional ^1H – ^{13}C HSQC experiment (Fig. S3), which confirmed

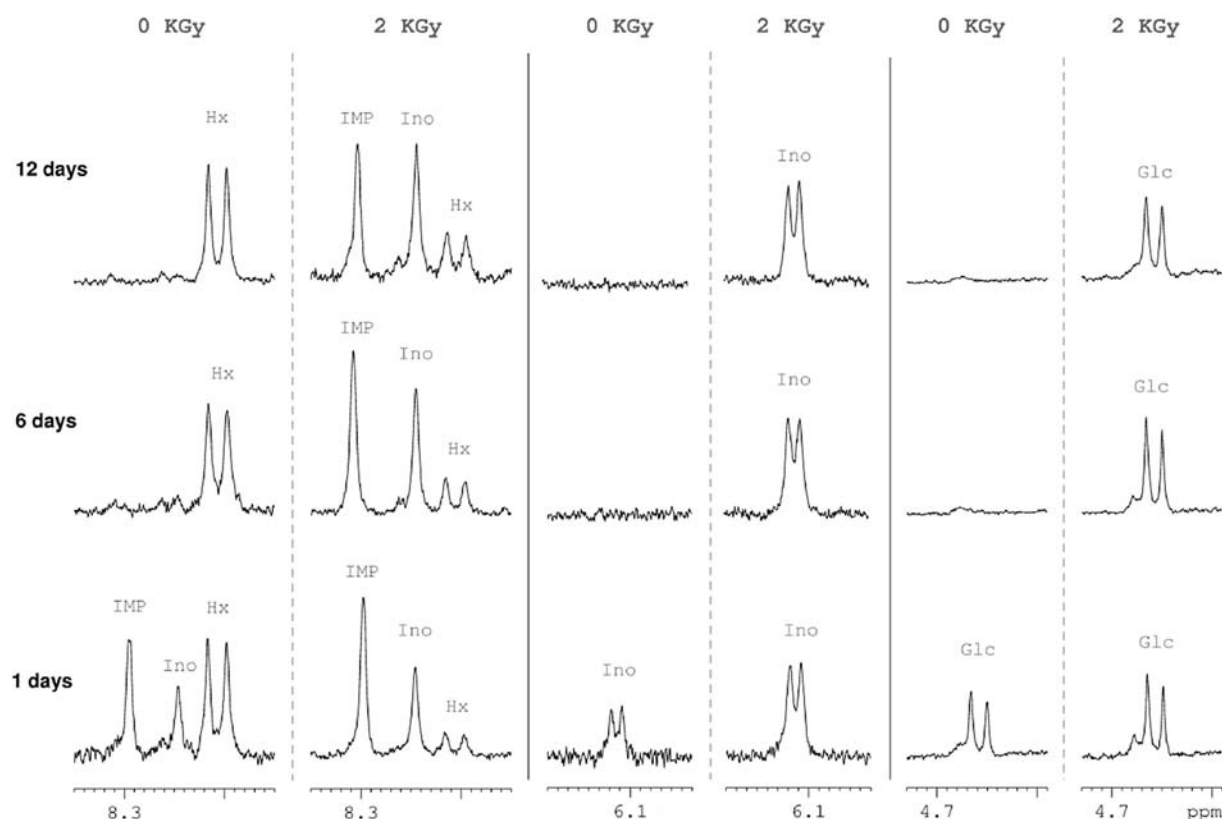


Fig. 1. Expanded regions of ^1H NMR CPMG exudate spectra from non-irradiated (0 KGy) and irradiated (2 KGy) samples of fresh salmon stored during 1, 6, and 12 days. Abbreviations: IMP, Inosine 5'-phosphate; Ino, Inosine; Hx, Hypoxanthine; Glc, Glucose.

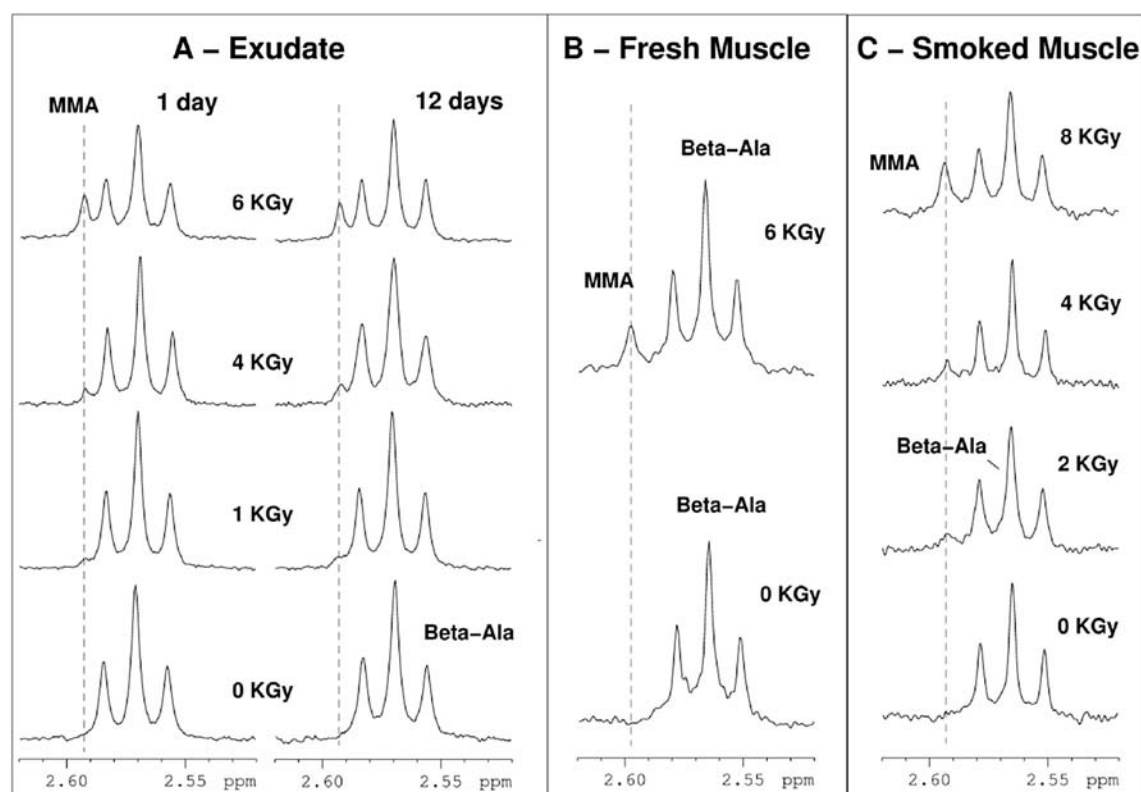


Fig. 2. Enlargement of the region between 2.60 and 2.52 ppm of ¹H NMR spectra from fresh salmon exudate (A); fresh salmon muscle (B) and smoked salmon muscle (C) exposed to different irradiation doses, and stored during 1 day (A, B, and C) or 12 days (A).

the cross-peak expected for the MMA. Fig. 2A shows the expanded region between 2.52 and 2.62 ppm that includes the MMA singlet and the beta-alanine triplet (β -Ala). As shown in the spectra, MMA signal intensity seems to be related to the applied irradiation dose and independent of storage time. ¹H-HRMAS spectra of fresh muscle (Fig. 2B) showed the same behavior. Finally, smoked salmon samples were evaluated to check whether the MMA signal was present. Fig. 2C shows the corresponding ¹H-HRMAS spectra for cold-smoked muscle. As in previous cases, the MMA signal was only present in irradiated samples and its intensity was also related to the applied irradiation dose. These results are in agreement with those obtained by Burks, Baker, Clark, Esslinger, and Lacey (1959), who reported an MMA increase in irradiated beef samples, and with those of Wu and Bechtel (2008), who analyzed the concentrations of ammonia, MMA, DMA, TMA, and TMAO in raw and processed fish by-products, without detecting MMA in any of the samples tested. Furthermore, our preliminary results with haddock exudates (data not shown) also point out the absence of MMA in non-irradiated samples stored anaerobically during 14 days. On the other hand, Angelini, Merritt, Mendelshon, and King (1975) detected MMA both in non-irradiated and irradiated haddock samples, although these results are hardly comparable with ours, since they correspond to fractions (basic and neutral) obtained after sample pretreatment.

Fig. 3 shows the integral values of the three identified methylamine peaks (TMAO, TMA and MMA) in the ¹H NMR spectra of salmon exudates at different storage times and irradiation doses. In non-irradiated samples, non significant differences were found among the TMAO values during the storage, while the histogram of TMA, showed a very subtle, but significant ($P < 0.05$), decrease between day 1 and the rest of storage times (6 and 12 days). This small TMA diminution at the beginning of the storage is

not enough to contradict the minimum TMA variation found in previous works during the first fifteen days of storage (Castro, Padrón, Cansino, Velázquez, & Larriva, 2006; Papadopoulos, Chouliara, Badeka, Savvaidis, & Kontominas, 2003), especially taking into account that our results came from exudates samples. Furthermore, it is known that the small variations of TMAO and TMA during storage could be related to many different factors, such as pH and microbiota detected in fish (Castro et al., 2006). In the irradiated samples, the histogram of TMA showed a decrease in the peak area with increasing irradiation dose and with increasing storage time. This fact was expected because the bacterial load is reduced with the irradiation dose (Medina et al., 2009). Moreover, this decrease appears to be well-correlated with the increase in TMAO concentration with irradiation dose and storage time. This can be explained by the transformation of TMA to TMAO that may occur in an oxidative environment (Seibel & Walsh, 2002), such as the one generated by hydroperoxides resulting from irradiation (Katusin-Razem, Mihajevic, & Razem, 1990).

The MMA histogram (Fig. 3) suggests that the concentration of this methylamine is dependent on the degree of irradiation and independent of storage time (there were no significant differences between the three storage times at each dose used). This stability appears promising with a view to using the MMA signal as an indicator of sample irradiation. Similar trends have been observed in muscle samples (both fresh and smoked), although in these cases the variability among samples was much higher than that found among exudates, thus hampering to reach statistically founded conclusions. This variability might well be the consequence of the sample collection procedure (i.e., small piece taken from a bigger and relatively heterogeneous muscle sample). The association between increased MMA levels an irradiation treatment was already

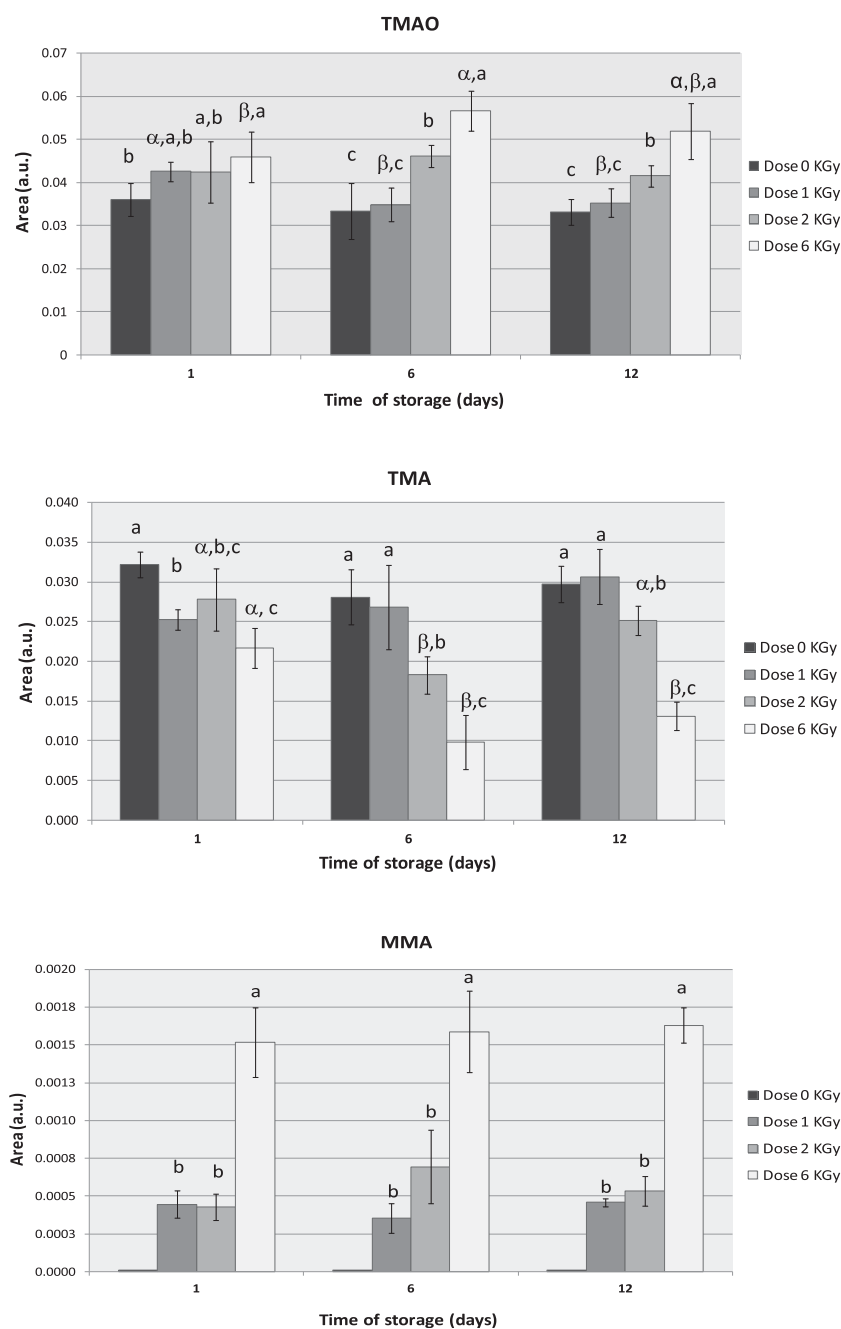


Fig. 3. Integral values (arbitrary units) of the spectral regions 3.26–3.32 ppm (TMAO), 2.86–2.92 ppm (TMA), and 2.58–2.60 ppm (MMA) of ^1H NMR spectra from salmon exudates. Bars represent mean values \pm standard deviations obtained after different storage times from samples exposed to different irradiation doses, as denoted by the gray codes. Bars with different letters (a, b and c) indicate significant differences ($P < 0.05$) depending on the dose at the same time of storage. Letters α and β represent significant differences ($P < 0.05$) depending on the storage time at the same dose."

reported by Burks et al. (1959), who found that the highest MMA values were associated with increased production of volatile amines as a result of irradiation treatment. Similar results have been obtained by our group in hake samples treated with E-beam radiation (unpublished data).

4. Conclusions

Our results show that MMA signal obtained by ^1H NMR is detected in all irradiated salmon samples, (exudate, fresh and smoked), and is not detected in non-irradiated ones. The MMA

signal intensity is well correlated with the dose applied and is stable during storage time. Therefore, the work presented in this paper suggest that the MMA signal obtained by NMR can be a valuable tool to monitor whether the original fish sample has been subjected to irradiation treatment.

Acknowledgment

The authors acknowledge financial support from MICINN (grants AGL2010-19158 and CTQ2010-14936) and collaboration of Research Professor Marta Herraiz (CSIC) and the members of the

CAI of NMR and RSE of the Complutense University.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.015>.

References

- American Society for Testing and Materials (ASTM). (2000). *E1650-97e1 standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems* (Vol. 12.02). West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Angelini, P., Merritt, C., Jr., Mendelshon, J., & King, F. (1975). Effect of irradiation on volatile constituents of stored haddock flesh. *Journal of Food Science*, 40(1), 197–199.
- Arvanitoyannis, I. S., Stratakis, A., & Mente, E. (2008). Impact of irradiation on fish and seafood shelf life: a comprehensive review of applications and irradiation detection. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 68–112.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Fish, whales, crustaceans, mollusks. In H. D. Belitz, W. Grosch, & P. Schieberle (Eds.), *Food chemistry* (pp. 617–639). Berlin: Springer.
- Burks, R. E., Baker, E. B., Clark, P., Esslinger, J., & Lacey, J. C. (1959). Irradiation effects in meat, detection of amines produced of irradiation of beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7(11), 778–782.
- Cambero, M. I., Cabeza, M. C., Escudero, R., Manzano, S., García-Márquez, I., Velasco, R., et al. (2012). Sanitation of selected ready-to-eat intermediate-moisture foods of animal origin by E-beam irradiation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(7), 594–599.
- Carlson, D. L., & Hites, R. A. (2005). Polychlorinated biphenyls in salmon and salmon feed: global differences and bioaccumulation. *Environmental Science & Technology*, 39(19), 7389–7395.
- Castejón, D., Villa, P., Calvo, M. M., Santa-María, G., Herraiz, M., & Herrera, A. (2010). ¹H-HRMAS NMR study of smoked atlantic salmon (*salmo salar*). *Magnetic Resonance in Chemistry: MRC*, 48(9), 693–703. <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.2652>.
- Castro, P., Padrón, J. C. P., Cansino, M. J. C., Velázquez, E. S., & Larriva, R. M. D. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, 17(4), 245–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.015>.
- Chauhan, S. K., Kumar, R., Nadanasabapathy, S., & Bawa, A. S. (2009). Detection methods for irradiated foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(1), 4–16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00063.x>.
- Chouliara, I., Savvaidis, I., Panagiotakis, N., & Kontominas, M. (2004). Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 21(3), 351–359.
- Chung, S., & Chan, B. (2009). Trimethylamine oxide, dimethylamine, trimethylamine and formaldehyde levels in main traded fish species in hong kong. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2(1), 44–51.
- García-Márquez, I., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., & Cabeza, M. C. (2012). Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection*, 75(12), 2179–2189.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Ordóñez, J., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2009). Raman spectroscopic study of electron-beam irradiated cold-smoked salmon. *Food Research International*, 42(1), 216–220.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. In H. H. Huss (Ed.), *FAO fisheries technical paper No. 348*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.
- Kasimoglu, A., Denli, E., & Ic, E. (2003). The extension of the shelf-life of sardine which were packaged in a vacuum stored under refrigeration, and treated by δ -irradiation. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(5), 529–535.
- Katusin-Razem, B., Mihajjevic, B., & Razem, D. (1990). Lipid test. *Nature*, 345(6276), 584. <http://dx.doi.org/10.1038/345584b0>.
- Licciardello, J. L., & Ronsivalli, L. J. (1982). Irradiation of seafoods. In R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Hebard, & D. Ward (Eds.), *Chemistry and biochemistry of marine food products* (pp. 305–322). Westport, Connecticut: AVI Publishing Co.
- Mannina, L., Sobolev, A. P., Capitani, D., Iaffaldano, N., Rosato, M. P., Ragni, P., et al. (2008). NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta*, 77(1), 433–444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.006>.
- Mark, J. J. P., Kumar, A., Demattio, H., Hoffmann, W., Malik, A., & Matysik, F. (2011). Combination of headspace single-drop microextraction, microchip electrophoresis and contactless conductivity detection for the determination of aliphatic amines in the biodegradation process of seafood samples. *Electroanalysis*, 23(1), 161–168.
- Martinez, I., Bathen, T., Standal, I. B., Halvorsen, J., Aursand, M., Gribbestad, I. S., et al. (2005). Bioactive compounds in cod (*gadus morhua*) products and suitability of ¹H NMR metabolite profiling for classification of the products using multivariate data analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6889–6895. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0507902>.
- Medina, M., Cabeza, M., Bravo, D., Cambero, I., Montiel, R., Ordóñez, J., et al. (2009). A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. *Food Microbiology*, 26(2), 224–227.
- Mendes, R., Silva, H. A., Nunes, M. L., & Empis, J. M. A. (2005). Effect of low-dose irradiation and refrigeration on the microflora, sensory characteristics and biogenic amines of atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technology*, 221(3–4), 329–335.
- Montiel, R., Cabeza, M. C., Bravo, D., Gaya, P., Cambero, I., Ordóñez, J. A., et al. (2013). A comparison between e-beam irradiation and high-pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: shelf-life, colour, texture and sensory characteristics. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3177–3185.
- Morehouse, K. M., & Komolprasert, V. (2004). Irradiation of food and packaging: an overview. In V. Komolprasert, & K. M. Morehouse (Eds.), *ACS symposium series: Vol. 875. Irradiation of food and packaging: Recent developments* (pp. 1–11). Washington, DC: American Chemical Society.
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I., & Kontominas, M. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20(4), 411–420.
- Piras, C., Scano, P., Locci, E., Sanna, R., & Marincola, F. C. (2014). Analysing the effects of frozen storage and processing on the metabolite profile of raw mullet roes using ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 159, 71–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.160>.
- Schock, T. B., Newton, S., Brenkert, K., Leffler, J., & Bearden, D. W. (2012). An NMR-based metabolomic assessment of cultured cobia health in response to dietary manipulation. *Food Chemistry*, 133(1), 90–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.077>.
- Seibel, B. A., & Walsh, P. J. (2002). Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *The Journal of Experimental Biology*, 205(3), 297–306.
- Thayer, D. W., Fox, J. B., & Lakritz, L. (1993). *Effects of ionizing radiation treatments on the microbiological, nutritional, and structural quality of meats* (p. 293). Washington, DC: American Chemical Society. ACS Symposium Series 528.
- Venugopal, V., Doke, S., & Thomas, P. (1999). Radiation processing to improve the quality of fishery products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(5), 391–440.
- Villa, P., Castejón, D., Herraiz, M., & Herrera, A. (2013). ¹H-HRMAS NMR study of cold smoked atlantic salmon (*Salmo salar*) treated with E-beam. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 51(6), 350–357. <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.3957>.
- World Health Organization (WHO), & Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1988). *Food irradiation: A technique for preserving and improving the safety of food*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization (WHO). (1999). Technical report series. *Wholesomeness of irradiated foods* (Vol. 659). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wu, T. H., & Bechtel, P. J. (2008). Ammonia, dimethylamine, trimethylamine, and trimethylamine oxide from raw and processed fish by-products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17(1), 27–38.
- Zhou, S., & Ackman, R. G. (2003). Storage of off-flavors in adipocytes of salmon muscle. In A. M. Rimando, & K. K. Schrader (Eds.), *Off-flavors in aquaculture* (pp. 95–106). Washington: American Chemical Society. ACS symposium series 848.

SUPPORTING INFORMATION

(4 pages)

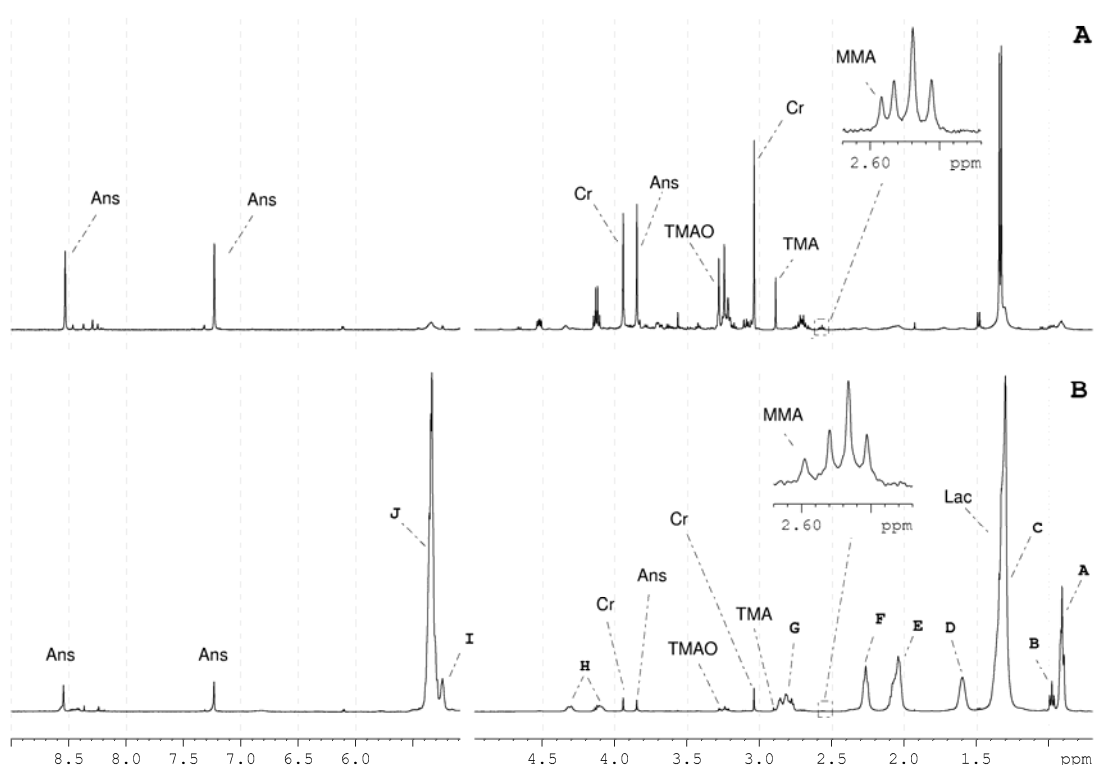
Manuscript entitled: NMR-detection of methylamine compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to E-beam irradiation

D. Castejón, J.M. García-Segura, A. Herrera, M.I. Cambero

Table of contents

- 1) **Figure S1.** Representative ^1H NMR spectra of salmon exudate and salmon muscle. p 2.
- 2) **Figure S2.** Mono-Methylamine (MMA) assignment. p 3.
- 3) **Figure S3.** Mono-Methylamine (MMA) assignment. ^1H - ^{13}C HSQC spectra p 4.

1) Figure S1. Representative ^1H NMR spectra of salmon exudate (A) and salmon muscle (B). The region (5.05-4.97 ppm) containing residual water contribution is excluded. Peak assignments are based on previous studies (Castejon, Villa, Calvo, Santa-Maria, Herraiz, & Herrera, 2010). Fatty Acid signals, mainly present in the HRMAS spectrum of part B, are denoted with letters (A-J) according to notation reported previously (Castejón, Mateos-Aparicio, Molero, Cambero, & Herrera, 2014).

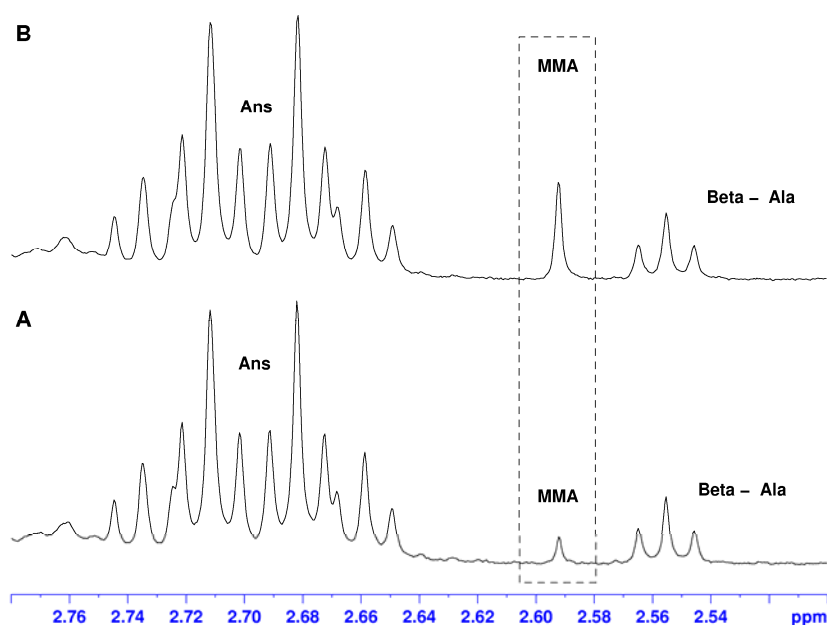


References

- Castejón, D., Mateos-Aparicio, I., Molero, M. D., Cambero, M. I., & Herrera, A. (2014). Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by ^1H -NMR. *Food Analytical Methods*, 7(6), 1285-1297.
- Castejon, D., Villa, P., Calvo, M. M., Santa-Maria, G., Herraiz, M., & Herrera, A. (2010). ^1H -HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Magnetic resonance in chemistry : MRC*, 48(9), 693-703.

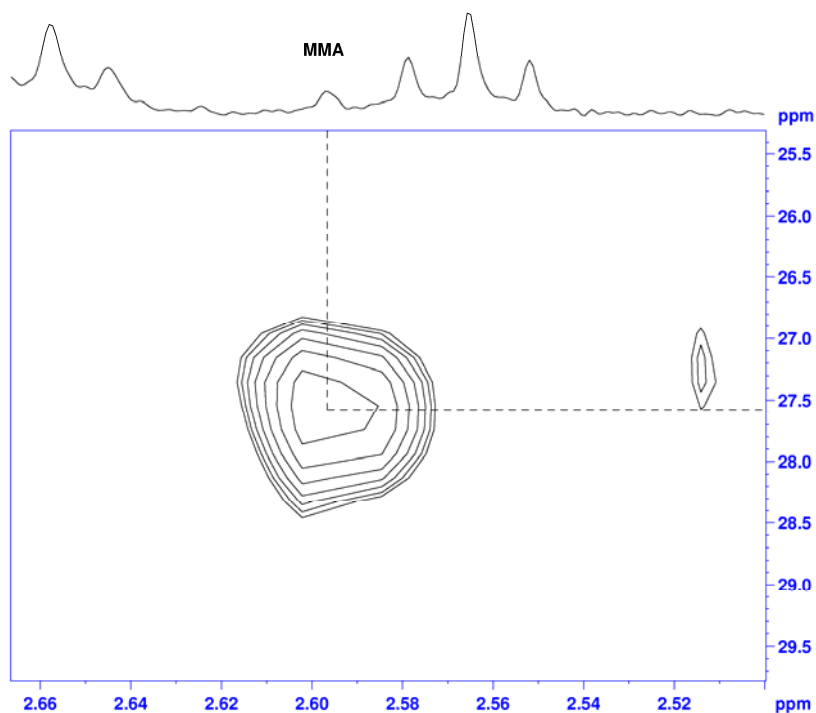
2) Figure S2 – Mono-Methylamine (MMA) assignment. A) ^1H NMR spectrum obtained without standard addition (MMA) and B) ^1H NMR spectrum after addition.

Figure S2-A shows the ^1H -NMR spectrum of salmon exudate obtained one day after purchase and treatment with a dose of 6K Gy. Figure S2-B shows the spectrum of the same sample after addition of methylamine hydrochloride as standard (Sigma-Aldrich (St Louis, MO)). These spectra were acquired in a Bruker AVANCE III 700 instrument with a 5-mm TCI cryoprobe equipped with shielded z-gradient coil operating at 700.17 MHz. The increase of the spectral resolution working with a higher magnetic field strength, allows to differentiate the singlet from methylamine (MMA) of the triplet of Beta-Alanine. As shown in the figure, the addition of the standard solution (MMA in D_2O) produces an increase in the signal of MMA. This result confirms the assignment of MMA.



3) **Figure S3. Mono-Methylamine (MMA) assignment. ^1H - ^{13}C HSQC spectra.**

Expanded region at 2.50 – 2.67 ppm of ^1H , ^{13}C HSQC spectra of salmon exudate. In the figure it is shown the unique bidimensional correlation (^1H ; ^{13}C) of the MMA structure (2.596, 27.570 ppm). This information is according with the HMDB database (2.593, 27.605 ppm). This ^1H - ^{13}C correlation allows us to confirm the assignment of MMA.



The ^1H - ^{13}C HSQC experiment was performed on a Bruker AVANCE III 700 instrument with a 5-mm TCI cryoprobe equipped with shielded z-gradient coil operating at 700.17 MHz. The acquisition was carried out in the phase-sensitive mode using Echo-Antiecho selection with decoupling during acquisition and shaped pulses, with presaturation during relaxation delay (1 s). The acquisition parameters were as follows: number of scans, 64; number of data points, 2048 for ^1H and 192 for ^{13}C ; spectral width, 12626 Hz (^1H) and 35214 Hz (^{13}C); acquisition time, 0.081 s; the relaxation delay was set to 0.9 s in order to monitor a ^1J (^1H - ^{13}C) value of 133 Hz. Linear prediction in f2 and unshifted squared sinusoidal window function in both dimensions were applied before Fourier transformation. ;

III.2.2. APLICACIÓN EN MUESTRAS CÁRNICAS.



III.2.2.1: ESTUDIO METABOLÓMICO DEL EXUDADO CÁRNICO: POTENCIAL PARA LA MONITORIZACIÓN DEL ALMACENAMIENTO DE LA CARNE.

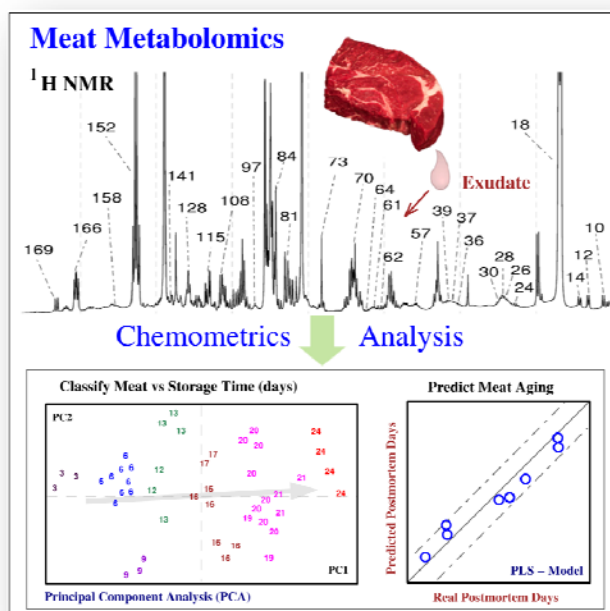
III.2.2.1: ESTUDIO METABOLÓMICO DEL EXUDADO CÁRNICO: POTENCIAL PARA LA MONITORIZACIÓN DEL ALMACENAMIENTO DE LA CARNE.

La carne, y más en concreto la de vacuno, es un producto especialmente valorado por el consumidor por sus atributos nutricionales y sensoriales. Para una evaluación global de ambas características se requiere de métodos analíticos adecuados no destructivos o invasivos, capaces de proporcionar una imagen completa del metaboloma muscular utilizando muestras íntegras. Uno de los principales aspectos que contribuyen a la calidad sensorial de la carne es su sabor, relacionado directamente con su composición química, y en especial con las sustancias de bajo peso molecular (nucleótidos, aminoácidos, dipéptidos y azúcares). El contenido de estos compuestos se incrementa durante el almacenamiento de la carne en los procesos post-mortales propios de su maduración.

En el presente trabajo (7), se estudió mediante ^1H -RMN el exudado de la carne de ternera para evaluar su potencial como matriz de análisis no invasiva. El exudado, como un producto de lixiviación liberado por la carne cruda durante su almacenamiento, sería una muestra fácil de obtener en los propios envases comerciales de la carne sin ninguna manipulación ni deterioro de las piezas comerciales. Pese a las ventajas, como material de análisis, el exudado ha sido poco estudiado y que los autores sepan, no existen referencias bibliográficas en las que se haya utilizado para evaluar la calidad de la carne. Los exudados de 48 muestras de solomillo de ternera de diferente raza, sexo y tiempos de almacenamiento fueron estudiados mediante espectroscopía de ^1H -RMN. Los espectros de los exudados se compararon con los obtenidos, del análisis directo de las piezas de carne. La estrecha correlación encontrada entre ambos espectros (superior al 95% de coincidencia y un coeficiente de correlación de *Spearman* = 0.945), permitió concluir que el exudado cárnico es una matriz analítica representativa de la carne para la realización de estudios metabolómicos. En el análisis de los exudados mediante RMN se identificaron 60 metabolitos, de los cuales 23 fueron asignados por primera vez en estudios de RMN en carne. Además, la aplicación de las herramientas quimiométricas al conjunto de datos espectroscópicos puso de manifiesto cuales fueron los metabolitos que sufrieron variaciones significativas durante el envejecimiento de la carne. El estudio metabolómico realizado, basado en los datos de RMN de

exudado, hicieron posible la clasificación de las muestras de carne de acuerdo a su tiempo de almacenamiento a través del Análisis de Componentes Principales (PCA), así como la predicción del tiempo de almacenamiento de las muestras a través del análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS).

En función de los resultados obtenidos es posible concluir que los perfiles espectrales de ^1H -RMN de los exudados de la carne podrían utilizarse en la monitorización del almacenamiento y maduración de la carne. El trabajo futuro en esta prometedora línea de investigación debería encaminarse a la construcción de bases sólidas de datos espectroscópicos de exudados con el objetivo de aplicar la información metabólica en distintos campos de interés para la Industria Alimentaria, como la monitorización del procesado, evaluación de la calidad, trazabilidad y control de fraudes.



Trabajo 7

“Metabolomic of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging”

“Because of the exceptional high quality of your article, your article will be published as a “featured article”.” (Allen Hubert, Journal Manager of Analytica Chimica Acta)

Anal. Chim. Acta **2015** (aceptado DOI: 10.1016/j.aca.2015.08.032)

Parte de este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en el “II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria ACOFESAL 2013” celebrado en Madrid en junio de 2013.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging

David Castejón^a, Juan Manuel García-Segura^{a, b}, Rosa Escudero^c, Antonio Herrera^d,
María Isabel Cambero^{c, *}

^a Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

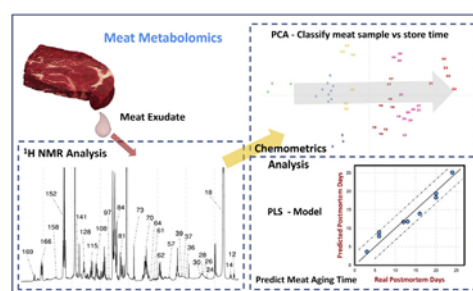
^c Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^d Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- NMR spectra from beef samples and their exudates are very strongly correlated.
- 23 metabolites not reported in previous NMR meat studies have been identified.
- Meat exudate NMR spectra allow monitoring of biochemical changes related to aging.
- PCA of exudate NMR spectra classified meat samples by their storage time.
- The aging of a meat sample can be predicted by PLS analysis of its exudate.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2015

Accepted 13 August 2015

Available online xxx

Keywords:

Beef

Exudate

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

Metabolomics

Principal component analysis

Partial least squares

ABSTRACT

In this study we analyzed the exudate of beef to evaluate its potential as non invasive sampling for nuclear magnetic resonance (NMR) based metabolomic analysis of meat samples. Exudate, as the natural juice from raw meat, is an easy to obtain matrix that it is usually collected in small amounts in commercial meat packages. Although meat exudate could provide complete and homogeneous metabolic information about the whole meat piece, this sample has been poorly studied. Exudates from 48 beef samples of different breeds, cattle and storage times have been studied by ¹H NMR spectroscopy. The liquid exudate spectra were compared with those obtained by High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) of the original meat pieces. The close correlation found between both spectra (>95% of coincident peaks in both registers; Spearman correlation coefficient = 0.945) lead us to propose the exudate as an excellent alternative analytical matrix with a view to apply meat metabolomics. 60 metabolites could be identified through the analysis of mono and bidimensional exudate spectra, 23 of them for the first time in NMR meat studies. The application of chemometric tools to analyze exudate dataset has revealed significant metabolite variations associated with meat aging. Hence, NMR based metabolomics

* Corresponding author.

E-mail address: icambero@vet.ucm.es (M.I. Cambero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.032>

0003-2670/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

have made it possible both to classify meat samples according to their storage time through Principal Component Analysis (PCA), and to predict that storage time through Partial Least Squares (PLS) regression.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Beef is one of the meat products with increased demand and commercial value. In the western world its consumption has markedly grown in the last few decades [1]. As a consequence, there is an increasing need for proper analytical methods capable of giving a complete picture of muscle metabolome and of assessing meat nutritional quality [1,2]. One of the main aspects that contributes to the sensory quality of beef is its flavor, which is directly related to the chemical composition, especially of such low molecular weight compounds as nucleotides, amino acids, dipeptides and sugars [3], which have been related to meat aging processes [3,4]. The levels of these compounds in beef meat are usually determined by extraction procedures followed by analysis, which often imply the use of different analytical techniques for each group of metabolites. For example, Koutsidis et al. [5] used Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC–MS) to measure sugars, capillary electrophoresis (CE) to characterize the nucleotides and the derivatization technique EZ-Faast (Phenomenex, Torrance, CA) coupled with GS-MS to analyze amino acids.

High resolution Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is a well established technique that, when applied to complex mixtures, allows the simultaneous detection of a large number of their low molecular weight components. Hence, NMR spectroscopy is gaining wide acceptance in food analysis due to its potential for giving very exhaustive representations of the chemical composition of the food matrix without extensive manipulation [2]. Particularly, NMR spectroscopy has been employed to obtain metabolite profiles of meat samples, including different cattle breeds [6], beef [1,3,7,8], duck [4], horse [9], pig [10] or lamb [11]. For this goal, the NMR spectroscopy modality known as High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS-NMR) has proved to be very useful for reliably assessing the metabolic profile (metabolome) of intact muscle samples [6,7,11]. Thus, this modality has been applied to investigate factors that somehow affect meat properties, such as the geographical origin of cattle [1,7,11], type of cattle feeding [11], type of breeds [6] or the relationship between meat aging and flavor [3,4,12]. Nevertheless, in comparison with other foods, meat has hardly been investigated by NMR [6].

Meat exudate is the aqueous solution, mainly constituted by proteins and their degradation byproducts, which comes out of fresh meat during storage. Different theories have been proposed to explain the physicochemical mechanisms involved in meat exudation or drip loss, the most accepted being shrinkage of myofibrils during rigor development [13], and occurrence of tissue damage due to cutting [14]. However, the reasons why drip losses vary from carcass to carcass, even under controlled environmental conditions, are not fully understood [15].

Meat exudates mainly contain water soluble sarcoplasmic proteins mixed with nucleotides, amino acids, peptides, proteins, and many soluble enzymes [16]. They are valueless, easy to obtain and, their presence in small amounts in commercial meat packages cannot be associated with significant degradation or alteration of the meat from which they proceed. They should, therefore, be considered as the natural juice from raw meat that, conveniently analyzed, could provide homogeneous information about the

whole meat sample. Hence, the composition of pork exudates has been correlated with quality characteristics of fresh and thawed meat [17], and with water holding capacity and postmortem aging [18]. However, in spite of this potential, meat exudates have rarely been employed for meat analysis.

Therefore, the aims of this study were i) to assess the value of beef exudates for NMR based meat analysis, ii) to characterize the major metabolites present in beef exudates, iii) to evaluate the ability of ^1H NMR to characterize the chemical changes in beef exudate during storage and iv) to apply NMR based chemometric techniques to classify beef samples according to postmortem time (aging).

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Forty eight raw beef tenderloins (psoas major, psoas minor and iliacus) were collected from five local butcher's shops. Meat samples differed in their postmortem periods, which ranged from 3 to 24 days [3 days postmortem (3 samples), 6 days (9), 9 days (3), 12 days (3), 13 days (4), 16 days (6), 17 days (3), 19 days (3), 20 days (4), 21 days (6), and 24 days (4)]. According to local regulations, meat had been stored before purchasing at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ with a relative humidity of 83–85%. Thermally insulated containers were employed during transportation of the samples to the laboratory, which, in all cases, took no longer than 1 h. Once at the lab, samples were kept refrigerated at 4°C until being subjected to the following exudate collection procedure: the same day of purchase, 50 g pieces of beef samples were vacuum packed at 20 kPa in 10×10 cm laminated film bags (90 μm copolymer of polyamide/polyethylene) of low gas permeability (transmission rates of $35\text{ cm}^3\text{ 24 h}^{-1}\text{ m}^{-2}\text{ bar}^{-1}$ and $150\text{ cm}^3\text{ 24 h}^{-1}\text{ m}^{-2}\text{ bar}^{-1}$ for O_2 and CO_2 , respectively) and stored at 4°C . After 24 h storage the released exudate was collected, frozen at -80°C , and freeze dried at room temperature. The freeze dried exudates were stored at -80°C until NMR analysis. Six representative samples of beef tenderloins, after collecting their exudates, were frozen at -80°C until HRMAS-NMR analysis.

2.2. Preparation of samples for NMR analysis

For ^1H NMR analysis 18 mg from each lyophilized exudate were reconstituted in an eppendorf tube by adding 650 μL of D_2O , containing 1 mM sodium trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP, SigmaAldrich) as internal reference. The mixture was vortexed for 30 s and then transferred to a 5 mm NMR tube.

For ^1H HRMAS analysis, 10 mg samples of beef muscle together with 25 μL of 1 mM TSP were placed into 50 μL MAS zirconia rotors and fitted with top cylindrical inserts to increase homogeneity.

2.3. NMR analysis

2.3.1. One dimensional NMR experiments

^1H NMR spectra of the reconstituted exudates were recorded randomly at 277 K on a Bruker AMX500 MHz spectrometer using a reverse detection probe (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten,

Germany). For each sample, two monodimensional ^1H NMR spectra were recorded using the following pulse sequences: 1D NOESY (NOESYPRESAT) and CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill), both with water suppression. The 1D NMR experiments were acquired with 32k time domain data points, 18 ppm spectral width, 64 scans and 2 s of relaxation delay. A mixing time of 150 ms was used in the 1D NOESY experiment and an echo time of 50 ms was selected for the CPMG sequence. The free induction decays (FIDs) obtained were processed with Bruker BioSpin TOPSPIN software (version 2.1) as follows: exponential filtering ($\text{LB} = 1$ Hz), Fourier Transformation (FT), spectral phasing and baseline correction.

^1H HRMAS NMR spectra of beef samples were recorded at 277 K on the same spectrometer employed for the liquid exudates but using a Bruker HRMAS probe. Rotors were spun at 4 kHz. Standard solvent suppressed spectra (NOESYPRESAT) were acquired with 16k time domain data points, 16.6 ppm spectral width, 128 scans, 2 s of relaxation delay, and 150 ms of mixing time. The FIDs so obtained were subjected to exponential filtering ($\text{LB} = 0.3$ Hz) then Fourier transformed and the resulting spectra phased and baseline corrected as before.

2.3.2. Two dimensional NMR experiments

Assignments of NMR signals were based on standard two dimensional experiments; namely, ^1H – ^1H COSY, ^1H – ^1H TOCSY, ^1H – ^{13}C HSQC, and ^1H – ^{13}C HMBC. For liquid samples (reconstituted exudates) homonuclear water suppressed COSY and TOCSY experiments were performed with 2k data points in t_2 domain and 384 increments in t_1 , each with 64 scans. Spectral widths of 13 ppm were employed in both dimensions. Mixing times of 70 ms were used for TOCSY experiments. Heteronuclear HSQC and HMBC experiments of these liquid samples were performed as follows: 2k data points in t_2 domain and 384 increments in t_1 , each with 256 scans; spectral widths of 13 ppm for f_2 dimension and 260 ppm for f_1 dimension; coupling constant values of 145 Hz and 10 Hz were employed to set delay durations for short range and long range correlations, respectively. In all cases, two dimensional data sets were enhanced in the first dimension by forward linear prediction from 384 to 512 real data points followed by zero filling to 1024 data points. In addition, squared sine bell window functions were applied in both dimensions prior to Fourier Transformation. 2D HRMAS NMR experiments performed on muscle samples are described in the supplementary data (Section S1).

2.3.3. Spectral assignment

Assignment of resonances in the ^1H NMR spectra from beef exudates was based on both spin connectivity information obtained from 2D experiments and the use, as guidelines, of both data reported in the literature [1,3,6], and data obtained from HMDB database (Human Metabolite Data Base <http://www.hmdb.ca/>).

2.4. Statistical analysis

A total of 48 beef exudate spectra were subjected to Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Square Analysis (PLS) using AMIX software (version 3.9.11, Bruker BioSpin). Prior to these multivariate analyses each individual spectrum was data reduced over the 9.05–0.93 ppm range by dividing it into spectral regions (buckets) of variable width. These variable widths were chosen to account for the chemical shift variations due to working with nonbuffered exudates. Regions with spectral artifacts (i.e. unsuppressed water region) were excluded from bucketing. A total of 54 buckets were defined (see Table S1 in supplementary data), and the integral of each of them, calculated by summing up the intensities of all its points, was divided by the total number of points in the bucket. In order to account for the variable

concentration of each reconstituted exudates, its bucket intensities were normalized to the total spectral intensity over the whole spectrum.

For the unsupervised PCA analysis a 48×54 matrix was built, its rows representing the different beef exudate samples (cases) and its columns the integrated buckets (variables). These columns were scaled to unit variance prior to PCA calculations, resulting in all the buckets becoming equally important in the final analysis; in short, case clustering, if evidenced, should be explained by differences in the metabolite profile of the cases rather than in their metabolite absolute levels. The number of Principal Components (PCs) employed for PCA was established as the minimum required to explain 95% of the total variance. Significance analysis of variables (buckets) was based on the procedure of Goodpaster et al. [19] using a confidence level of 95%.

For the supervised PLS analysis, a cross validation scheme with several rounds was employed for calibration and testing. Thus, for each round, sets of 9 spectra, randomly selected from the whole sample, were split out from the 48×54 matrix employed for PCA. The resulting 39×54 matrix was then used as X table (independent variable), and the Y table or dependent variable was a column vector of 39 components, one per sample, whose values were fixed to the number of days after slaughtering of the original meat samples. The van der Voet test [20] was used to set the least number of factors for the PLS analysis. Root mean square error of prediction, RMSEP, was calculated for each step by using the 9 split out spectra as the testing set.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of ^1H NMR spectra of beef exudate

Fig. 1 shows the comparison between representative ^1H NMR spectra of exudate (1A) and meat (1B). At first glance, there are obvious similarities between both spectra. A closer inspection revealed that, excluding fatty acid (FA) signals only present in meat, practically all the peaks in meat spectra ($98.0 \pm 0.3\%$; $n = 6$) have their counterpart in exudate spectra. Thus, signals from amino acids, dipeptides, carbohydrates, organic acids and nucleotides, already reported as present in meat samples from different ruminant species [6], are also clearly observed in the ^1H spectra from exudates. A list of all the metabolites identified in the NMR spectra and their spectroscopic data are displayed in Table 1. Similarities found between exudate and meat spectra do not only concern the peaks present in each of them, but also their relative intensities. Hence, working with relative bucket intensities (i.e., ratios of each bucket to the one at 3.86 ppm in the spectrum; in other words, ratios to the signal of anserine, a dipeptide which is present at high and relatively constant concentrations in skeletal muscle [21,22], a very strong correlation, $\rho = +0.945$ ($p = 0.01$), has been found between meat HRMAS and exudate spectra, provided that the buckets containing lipid contributions in the HRMAS spectra were excluded from the analysis. Spearman's rank correlation was employed to assess this correlation due to the non normal distribution of the bucket ratios analyzed. Fig. 2 illustrates this strong correlation, which permits us to infer that recording an exudate spectrum can be taken as an excellent alternative to the most involved registering of an HRMAS spectrum from the original meat piece. As expected from the aqueous nature of the exudates, only short chain FA are present, whereas ^1H meat spectra (Fig. 1B) show broad signals from long chain FA forming part of the lipid fraction. These contributions are marked with capital letters in Fig. 1, in accordance with the general assignments specified in Table S2 [23].

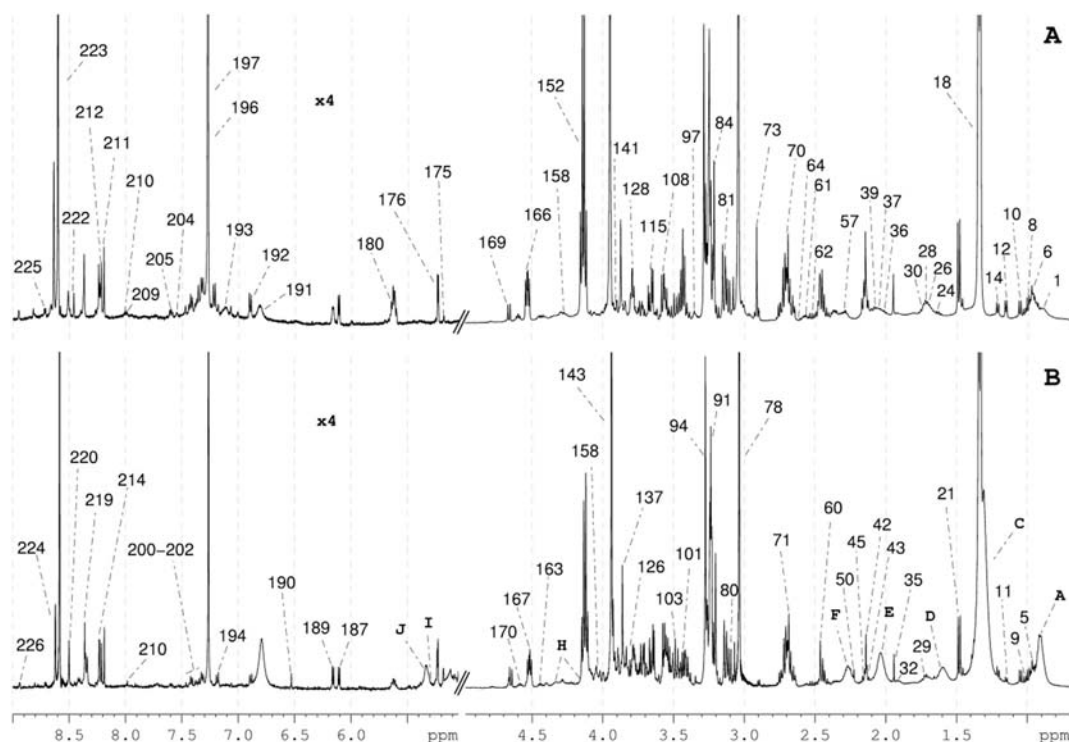


Fig. 1. Representative ^1H NMR spectra of beef exudate (A) and beef meat (B). The region (5.05–4.97 ppm) containing residual water contribution is excluded. Peak assignments are given in Table 1. Fatty Acid signals, only present in the HRMAS spectrum of part B, are denoted with letters (A–J) according to the assignments given in Table S1 of the Supplementary Data.

3.2. ^1H NMR spectrum assignment

As already mentioned in M&M, peak assignments were mainly based on spin connectivities established through 2D NMR spectra. In the Supplementary Information (Fig. S1 to S7), some exudates 2D spectra employed for this purpose are shown. As a result, a total of 60 metabolites have been assigned (Table 1), allowing us to provide, through the use of exudates, a metabolic profile of beef meat more exhaustive than previously reported (i.e., just 25 metabolites [1] or 26 metabolites [3] previously identified in beef extracts or 33 metabolites in beef muscle [6]). All the assigned metabolites, classified by their chemical nature, are listed in the following paragraphs, where those described herein for the first time in NMR meat studies are shown underlined. (Abbreviations in Table 1).

Amino Acids, Peptides and analogues: Ans; Arg; Bet; Cart; Car; Cr; PCr; GABA; Glu; Gln; GSH; Ile; Leu; Lys; Met; Phe; Pro; Ser; Tau; Thr; Trp; Tyrm; Tyr; Val; α -Ala and β -Ala. In contrast with previous NMR meat studies [3,6], we have found no Asp in the exudates. This fact, also found by Jung et al. in beef [1], can be explained by the low levels of this amino acid in muscle samples [5,24] which probably results in exudate Asp levels under the NMR detection threshold.

Carbohydrates and Carbohydrate Conjugates. Glycerol; α -Glc, β -Glc, α -Man, α,β -Ribopyranose and α,β -Ribofuranose.

Organic Acids and Derivates. AA; BA; CA; FoA; FuA; 2-HBA; 3-HBA; LA; OACart; PA and SA.

Nucleosides, Nucleotides and Analogues. ATP, ADP, AMP, IMP, Ino, Hx, Xan, Ud, UdP, CyP and U.

Miscellaneous. The remaining metabolites identified were 2,3-Butanediol, EtOH, Acetone, TMA, Crn, Cho, PCho, GPCho and NA. Signals from free FA, including BA, and signals from metabolites not identified (NI) are shown in Table 1.

We consider that the close correlation found between meat and exudate ^1H NMR spectra (Paragraph 3.1) and the thorough

assignment work carried out on exudate spectra (Paragraph 3.2) give sufficient justification to study meat aging using the NMR spectra acquired from the respective meat exudates.

3.3. Exudate spectra evolution during beef aging

In order to evaluate the effect of aging, forty eight meat samples that differed in their postmortem periods were analyzed by recording the ^1H NMR spectra of their exudates. At first sight, the obtained spectra did not show obvious differences among them however, a more detailed analysis of the spectra evidenced subtle changes between samples which could be associated with the postmortem time of the corresponding meat piece. Aging effects have already been reported in polar extracts ^1H NMR spectra from duck [4] and beef [3].

Multivariate analysis tools were used to elucidate the rationale behind these subtle variations. The best results were achieved from spectral data acquired by CPMG, due to the ability of this pulse sequence to remove broad protein signals [25]. Unsupervised PCA was performed on the entire dataset, i.e. 48 samples of 54 buckets each, ranging from 3 to 24 postmortem days. As a result, 95.75% of the variance was explained by the first 13 Principal Components (PCs). Fig. 3A shows the scores plot for the first two PCs with which the exudates samples were best clustered. In particular, PC1 mostly accounted for exudate classification according to meat aging. The arrow in Fig. 3A follows the aging tendency line calculated by linear regression of the averaged score values at each postmortem day.

We arbitrarily decided to group our exudates into two classes according to the storage time of the corresponding meat samples: less or longer than 2 weeks, Group 1 or Group 2, respectively. This grouping allowed us to search for buckets with values significantly different between both groups [19]. These buckets, the main metabolites present in each of them, and the variations observed with

Table 1

Signal assignments for ¹H-NMR spectra from beef exudates. Bolded metabolites are indicated in Fig. 1 and bolded 2D correlations are shown in Figs. S1 To S7 of Supplementary information.^{a)} Abbreviations: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; qu, quintet; m, multiplet; dd, doublet of doublets.

Peak	Compound	Abbreviation	Group	¹ H(ppm)	Mult.:J(Hz)	Assignment data
1	Fatty acid	FA	CH ₃	0.88	t	COSY(1.31) TOCSY(1.25)
2	Butyric acid	BA	δ-CH ₃	0.91	t:7.39	COSY(1.58) TOCSY(2.18)
3	Not identified A	NI-A	—	0.95	—	COSY(2.09) TOCSY(4.44)
4	2-Hydroxybutyric acid	2-HBA	CH ₃	0.95	m	COSY(1.62) TOCSY(4.10) HSQC(12.86)
5	Isoleucine	Ile	δ-CH ₃	0.96	t	COSY(1.27;1.47) TOCSY(2.00) HSQC(13.80)
6	Leucine	Leu	δ'-CH ₃ /δ'-CH ₃	0.97	m	COSY(1.72) TOCSY(3.74) HSQC(24.35)
7	Not identified A	NI-A	—	0.99	—	COSY(2.09) TOCSY(4.44)
8	Valine	Val	γ-CH ₃	1.00	d:7.05	COSY(2.29) TOCSY(3.63) HSQC(19.50)
9	Isoleucine	Ile	γ-CH ₃	1.02	d:7.05	COSY(2.00) TOCSY(1.27;1.47;3.68) HSQC(17.40)
10	Valine	Val	γ'-CH ₃	1.05	d:7.02	COSY(2.31) TOCSY(3.63) HSQC(20.74)
11	2,3-Butanediol	-	CH ₃	1.15	d:6.12	COSY(3.73) HSQC(20.46) HMBC(73.60)
12	2,3-Butanediol	-	CH ₃ '	1.15	d:6.12	COSY(3.63) HSQC(19.60) HMBC(73.60)
13	Ethanol	EtOH	CH ₃	1.19	t	COSY(3.66) HSQC(19.45)
14	3-Hydroxybutyric acid	3-HBA	CH ₃	1.21	d:6.86	COSY(4.00) TOCSY(2.31;2.42) HSQC(24.55)
15	Isoleucine	Ile	γ-CH ₂	1.27	m	COSY(0.96;1.47) TOCSY(1.02)
16	Fatty acid	FA	(CH ₂) _n	1.30	—	COSY(1.57;2.04)
17	Threonine	Thr	γ-CH ₃	1.33	—	COSY(4.26) TOCSY(3.61)
18	Lactic acid	LA	CH ₃	1.34	d:6.96	COSY(4.13) HSQC(18.74)
19	Isoleucine	Ile	γ'-CH ₂	1.47	m	COSY(0.96;1.27) TOCSY(1.02) HSQC(27.20)
20	Lysine	Lys	γ-CH ₂	1.48	m	COSY(1.72) TOCSY(3.02) HSQC(24.89)
21	α-Alanine	α-Ala	β-CH ₃	1.48	d:7.25	COSY(3.77) HSQC(18.88)
22	Fatty acid	FA	COOH-CH ₂ CH ₂ CH ₂	1.57	—	COSY(1.30)
23	Butyric acid	BA	β-CH ₂	1.58	m:7.38	COSY(0.91; 2.18)
24	2-Hydroxybutyric acid	2-HBA	β-CH ₂	1.62	—	COSY(0.95;4.10)
25	Not identified B	NI-B	—	1.63	—	COSY(2.27) TOCSY(1.81;3.34)
26	Leucine	Leu	β-CH ₂	1.69	—	COSY(3.74) HSQC(42.43)
27	Arginine	Arg	γ-CH ₂	1.70	—	TOCSY(3.23; 3.76)
28	Leucine	Leu	γ-CH	1.72	m	COSY(0.97) HSQC(27.09)
29	Lysine	Lys	δ-CH ₂	1.72	m	COSY(1.48;3.01) TOCSY(1.91) HSQC(29.05)
30	Leucine	Leu	β'-CH ₂	1.74	m	COSY(3.74) HSQC(42.43)
31	Not Identified B	NI-B	—	1.81	—	COSY(3.34) TOCSY(1.63;2.27) HSQC(33.04)
32	Lysine	Lys	β-CH ₂	1.91	—	COSY(1.48;3.76) TOCSY(1.72;3.02) HSQC(32.38)
33	γ-Aminobutyric acid	GABA	β-CH ₂	1.91	m	COSY(2.31;3.02) HSQC(26.41)
34	Arginine	Arg	β-CH ₂	1.92	—	TOCSY(3.23; 3.76)
35	Acetic acid	AA	CH ₃	1.94	s	HSQC(25.77)
36	Isoleucine	Ile	β-CH	2.00	m	COSY(1.02) TOCSY(0.96) HSQC(38.66)
37	Proline	Pro	γ-CH ₂	2.02	m	COSY(3.35;3.42) TOCSY(4.15)
38	Fatty acid	FA	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ CH	2.04	—	COSY(1.30) TOCSY(5.33)
39	Glutamate	Glu	β-CH ₂	2.06	m	COSY(2.35) HSQC(29.70)
40	Proline	Pro	β-CH ₂	2.07	m	COSY(4.15) TOCSY(3.35;3.42)
41	Not identified A	NI-A	—	2.09	—	COSY(0.95;0.99) TOCSY(4.44)
42	Methionine	Met	S-CH ₃	2.10	s	HSQC(16.97)
43	Glutamate	Glu	β'-CH ₂	2.11	m	COSY(2.35;3.77) HSQC(29.70)
44	Not identified C	NI-C	—	2.13	—	TOCSY(2.58;2.91;4.43)
45	O-Acetylcarnitine	OACart	CH ₃ -COO	2.15	—	HSQC(23.30) HMBC(174.90)
46	Glutamine	Gln	β,β'-CH ₂	2.15	m	COSY(2.46;3.79) HSQC(29.43)
47	Methionine	Met	β-CH ₂	2.16	s	COSY(2.63;3.87) HSQC(32.74)
48	Glutathione	GSH	β,β'-CH ₂	2.16	m	COSY(2.55;3.79) HSQC(29.06)
49	Butyric acid	BA	α-CH ₂	2.18	t:7.33	COSY(1.58) TOCSY(0.91)
50	Acetone	-	CH ₃ -COO	2.22	s	HSQC(32.36)
51	Valine	Val	β-CH	2.29	m	COSY(1.00;1.05;3.62) HSQC(31.99)
52	Not identified B	NI-B	—	2.27	—	COSY(1.63) TOCSY(1.81; 3.34)
53	γ-Aminobutyric acid	GABA	α-CH ₂	2.31	—	COSY(1.91) TOCSY(3.02) HSQC(37.04)
54	3-Hydroxybutyric acid	3-HBA	α-CH ₂	2.31	—	COSY(4.15) TOCSY(1.21)
55	Proline	Pro	β'-CH ₂	2.36	m	COSY(4.15) TOCSY(3.35;3.42)
56	Pyruvic acid	PA	CH ₃	2.36	s	HSQC(29.59) HMBC(172.84)
57	Glutamate	Glu	γ-CH ₂	2.38	m	COSY(2.06;2.11) HSQC(36.10)
58	Succinic acid	SA	α,β-CH ₂	2.42	s	HSQC(36.86) HMBC(180.71)
59	3-Hydroxybutyric acid	3-HBA	α'-CH ₂	2.42	—	COSY(4.15) TOCSY(1.21)
60	Carnitine	Cart	α-CH ₂	2.45	m	COSY(4.59) TOCSY(3.46) HSQC(45.81)
61	Glutamine	Gln	γ-CH ₂	2.46	t:6.89	COSY(2.15) TOCSY(3.79) HSQC(33.55)
62	O-Acetylcarnitine	OACart	α-CH ₂	2.51	m	COSY(5.63;2.65) TOCSY(3.62;3.92)
63	Citric acid	CA	α-CH ₂	2.54	d:15.44	COSY(2.69) HSQC(48.24)
64	Glutathione	GSH	γ-CH ₂	2.55	m	COSY(2.16) HSQC(34.08)
65	β-Alanine	β-Ala	α-CH ₂	2.57	t	COSY(3.17) HSQC(36.30)
66	Not identified C	NI-C	—	2.58	—	TOCSY(2.13;2.91;4.43)
67	Methionine	Met	γ-CH ₂	2.63	—	COSY(2.16) TOCSY(2.63) HSQC(31.66)
68	O-Acetylcarnitine	OACart	α-CH ₂	2.66	m	COSY(5.63;2.51) TOCSY(3.62;3.92) HSQC(43.02)
69	Citric acid	CA	α'-CH ₂	2.68	d:15.44	COSY(2.54) HSQC(48.24)
70	Carnosine	Car	NH ₂ -CH ₂ -CH ₂	2.69	m	COSY(3.23) HSQC(34.20)
71	Anserine	Ans	NH ₂ -CH ₂ -CH ₂	2.70	m	COSY(3.23) HSQC(34.80)
72	Fatty acid	FA	CH=CH-CH ₂ -CH=	2.79	—	TOCSY(5.33)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Peak	Compound	Abbreviation	Group	¹ H(ppm)	Mult.:J(Hz)	Assignment data
73	Trimethylamine	TMA	N-CH ₃	2.91	s	HSQC(47.45)
74	Not identified C	NI-C	—	2.91	—	TOCSY(2.13;2.58;4.43)
75	Glutathione	GSH	CH ₂ -SH	2.97	d	COSY(4.59) HSQC(28.31)
76	γ-Aminobutyric acid	GABA	γ-CH ₂	3.02	t:7.66	COSY(1.91) TOCSY(2.31) HSQC(41.95) HMBC(26,70)
77	Lysine	Lys	ε-CH ₂	3.02	m	COSY(1.72) TOCSY(1.48;1.91;3.76) HSQC(41.83)
78	Creatine/Phosphocreatine	Cr/PCr	N-CH ₃	3.04	s	TOCSY(3.94) HSQC(39.60)
79	Creatinine	Crn	N-CH ₃	3.06	s	HSQC(32.90) HMBC(58.70; 170.80)
80	Anserine	Ans	β,β'-CH ₂	3.08	m	COSY(3.26;4.53) HSQC(28.69) HMBC(119.50; 179.30)
81	Carnosine	Car	β,β'-CH ₂	3.11	m	COSY(3.25;4.52) HSQC(30.20) HMBC(132.60; 179.30)
82	Phenylalanine	Phe	β,β'-CH ₂	3.13	m	COSY(3.28; 3.99)
83	β-Alanine	β-Ala	β-CH ₂	3.17	t	COSY(2.57) HSQC(39.69)
84	Choline	Cho	N(CH ₃) ₃	3.18	s	HSQC(56.60) HMBC(70.89)
85	Phosphocholine	Pcho	N(CH ₃) ₃	3.21	s	HSQC(56.60) HMBC(70.30)
86	O-Acetylcarnitine	OACart	N(CH ₃) ₃	3.21	s	HSQC(55.77)
87	Arginine	Arg	δ-CH ₂	3.23	—	TOCSY(1.70; 1.92)
88	Carnosine	Car	NH ₂ -CH ₂	3.23	m	COSY(2.69) HSQC(38.45) HMBC(174.30)
89	Anserine	Ans	NH ₂ -CH ₂	3.23	m	COSY(2.69) HSQC(38.45) HMBC(174.30)
90	Carnitine	Cart	N(CH ₃) ₃	3.24	s	HSQC(56.9) HMBC(71.89)
91	Carnosine	Car	β,β'-CH ₂	3.25	m	COSY(3.11;4.52) HSQC(30.2) HMBC(132.60; 179.30)
92	Anserine	Ans	β,β'-CH ₂	3.26	m	COSY(3.08;4.53) HSQC(28.69) HMBC(119.5; 179.30)
93	β-Glucose	β-Glc	CH-2	3.26	—	COSY(4.66) HSQC (76.90)
94	Betaine	Bet	N(CH ₃) ₃	3.27	s	HSQC(56.16) HMBC(68.82)
95	Taurine	Tau	N-CH ₂	3.27	t	COSY(3.43) HSQC(50.37)
96	Phenylalanine	Phe	β,β'-CH ₂	3.28	m	COSY(3.13; 3.99)
97	Proline	Pro	δ-CH ₂	3.35	m	COSY(2.02) TOCSY(2.07;2.36) HSQC(48.88)
98	β-Glucose	β-Glc	CH-4	3.40	—	COSY(3.49)
99	Proline	Pro	δ'-CH ₂	3.42	m	COSY(2.02) TOCSY(2.07;2.36) HSQC(48.88)
100	α-Glucose	α-Glc	CH-4	3.43	—	TOCSY(5.24) HSQC(72.34)
101	Taurine	Tau	N-CH ₂	3.43	t:6.74	COSY(3.27) HSQC (38.19)
102	β-Glucose	β-Glc	CH-5	3.45	—	COSY(3.90; 3.72) HSQC(72.34)
103	Carnitine	Cart	γ,γ'-CH ₂	3.45	m	COSY(4.59) HSQC (71.89)
104	β-Glucose	β-Glc	CH-3	3.49	—	TOCSY(4.66) HSQC(78.56)
105	β-Ribopyranose	—	CH-2	3.51	m	COSY(4.92)
106	Choline	Cho	CH-1	3.53	—	COSY(4.05) HSQC(70.08)
107	α-Glucose	α-Glc	CH-2	3.54	—	COSY(5.24) HSQC(73.86)
108	Glycerol	-	CH-1	3.57	dd:11.7; 6.6	COSY(3.66;3.79) HSQC(65.30)
109	Threonine	Thr	α-CH	3.61	—	COSY(4.26) TOCSY(1.33) HSQC(63.40)
110	Valine	Val	α-CH	3.62	d	COSY(2.29) TOCSY(1.00;1.05) HSQC(63.04)
111	O-Acetylcarnitine	OACart	γ-CH ₂	3.62	m	COSY(5.63;3.90)
112	Phosphocholine	Pcho	β-CH ₂	3.62	—	COSY(4.19) HSQC(70.17)
113	2,3-Butanediol	—	CH	3.63	—	COSY(1.15) HSQC (74.33)
114	Ethanol	EtOH	CH ₂	3.65	—	COSY(1.19)
115	Glycerol	-	CH ₂ -OH	3.66	dd:11.7; 4.30	COSY(3.57;3.79)HSQC(65.30)
116	Glycerophosphorylcholine	GPCho	β-CH ₂	3.67	—	COSY(4.34) HSQC(69.15)
117	Isoleucine	Ile	α-CH	3.68	d	COSY(2.00) TOCSY(1.02) HSQC(62.17)
118	2,3-Butanediol	—	CH'	3.73	—	COSY(1.15) HSQC (73.71)
119	α-Glucose	α-Glc	CH-3	3.72	—	TOCSY(5.24)
120	β-Glucose	β-Glc	CH ₂ -6,6'	3.72	—	COSY(3.45; 3.90) HSQC(63.54)
121	Leucine	Leu	α-CH	3.74	m	COSY(1.69; 3.74) TOCSY(0.97) HSQC(56.21)
122	Arginine	Arg	α-CH	3.76	—	TOCSY(1.70; 1.92)
123	Lysine	Lys	α-CH	3.76	m	COSY(1.91) TOCSY(3.02) HSQC(56.84)
124	Glutamate	Glu	α-CH	3.77	m	COSY(2.08) HSQC(56.70)
125	α-Alanine	α-Ala	α-CH	3.78	—	COSY(1.48) HSQC (53.06)
126	Glutathione	GSH	CH ₂	3.78	s	HSQC(46.10)
127	α-Glucose	α-Glc	CH ₂ -6,6'	3.78	—	HSQC(63.44)
128	Glycerol	-	CH-OH	3.79	m	COSY(3.57;3.66) HSQC(74.25)
129	Glutamine	Gln	α-CH	3.79	m	COSY(2.15) TOCSY(2.46) HSQC(56.70)
130	Glutathione	GSH	α-CH	3.79	m	COSY(2.16) HSQC(56.70)
131	α-Ribopyranose	—	CH-2	3.81	m	COSY(4.88)
132	α-Glucose	α-Glc	CH-5	3.84	—	TOCSY(5.24) HSQC(63.50)
133	α-Glucose	α-Glc	CH ₂ -6,6'	3.85	—	HSQC(63.44)
134	Inosine	Ino	CH-5 (Rib)	3.85	m	COSY(4.28) TOCSY(4.44)
135	Serine	Ser	α-CH	3.86	m	COSY(3.98) HSQC(59.00)
136	Methionine	Met	α-CH	3.87	—	COSY(2.16) TOCSY(2.63) HSQC(56.50)
137	Anserine	Ans	N-CH ₃	3.87	s	TOCSY(8.63) HSQC(35.70)
138	β-Glucose	β-Glc	CH ₂ -6,6'	3.90	—	COSY(3.45; 3.72) HSQC(63.54)
139	O-Acetylcarnitine	OACart	γ-CH ₂	3.90	m	COSY(5.63;3.62) TOCSY(2.51;2.66)
140	Inosine 5'-phosphate	IMP	CH ₂	4.02	m	COSY(4.36) TOCSY(4.51)
141	Betaine	Bet	α-CH ₂	3.92	s	HSQC(68.82) HMBC(56.16; 171.90)
142	α-Mannose	α-Man	CH-2	3.94	—	COSY(5.18)
143	Creatine/Phosphocreatine	Cr/PCr	α-CH ₂	3.94	s	TOCSY(3.04) HSQC(56.61)
144	Serine	Ser	β-CH ₂	3.98	m	COSY(3.86) HSQC(62.90)
145	Phenylalanine	Phe	α-CH	3.99	m	COSY(3.13; 3.28)
146	β-Ribofuranose	—	CH-2	4.00	m	COSY(5.26) HSQC(84.90)
147	3-Hydroxybutyric acid	3-HBA	β-CH	4.00	—	COSY(1.21)

Table 1 (continued)

Peak	Compound	Abbreviation	Group	¹ H(ppm)	Mult.:J(Hz)	Assignment data
148	Choline	Cho	α -CH ₂	4.05	—	COSY(3.53) HSQC(58.23)
149	Creatinine	Crn	CH ₂	4.01	s	HSQC(58.70)
150	2-Hydroxybutyric acid	2-HBA	α -CH	4.10	m	COSY(1.62) TOCSY(0.95)
151	α -Ribofuranose	—	CH-2	4.11	m	COSY(5.39) HSQC(85.88)
152	Lactic acid	LA	α -CH	4.13	q:6.94	COSY(1.34) HSQC(71.00)
153	Proline	Pro	α -CH	4.15	m	COSY(2.06;2.34) TOCSY(2.02;3.35;3.46) HSQC(63.70)
154	Phosphocholine	PCho	α -CH ₂	4.19	t	COSY(3.62) HSQC(60.91)
155	Threonine	Thr	β -CH	4.26	—	COSY(1.33;3.61) HSQC(68.60)
156	Inosine	Ino	CH-4 (Rib)	4.28	m	COSY(3.85;3.91;4.44) TOCSY(4.79)
157	Not identified D	NI-D	—	4.30	—	HSQC(56.21)
158	Glycerophosphorylcholine	GPCho	α -CH ₂	4.34	t	COSY(3.67) HSQC(62.07)
159	Uridine phosphate	UdP	CH	4.33	—	COSY(5.99)
160	Uridine	Ud	CH	4.34	—	COSY(5.92)
161	Inosine 5'-phosphate	IMP	CH-4 (Rib)	4.36	m	COSY(4.02)
162	Not identified A	NI-A	—	4.44	—	TOCSY(0.95;0.99;2.09) HSQC(62.97)
163	Inosine	Ino	CH-3 (Rib)	4.44	m	COSY(4.28;4.77) TOCSY(6.11)
164	Not identified C	NI-C	—	4.45	—	TOCSY(2.13;2.58;2.91) HSQC(65.61)
165	Inosine 5'-phosphate	IMP	CH-3 (Rib)	4.51	m	COSY(4.36;4.77) TOCSY(6.16)
166	Carnosine	Car	CH-COOH	4.52	m	COSY(3.11;3.25) HSQC(57.11)
167	Anserine	Ans	CH-COOH	4.53	m	COSY(3.08;3.26) HSQC(56.10)
168	Glutathione	GSH	CH	4.58	m	COSY(2.96) HSQC(58.30)
169	Carnitine	Cart	β -CH	4.59	m	COSY(3.45;2.45) HSQC(66.90)
170	β-Glucose	β-Glc	CH-1	4.66	d:7.92	COSY(3.26) TOCSY(3.49) HSQC(98.46)
171	Inosine 5'-phosphate	IMP	CH-2 (Rib)	4.77	m	COSY(4.51;6.16) TOCSY(4.36)
172	Inosine	Ino	CH-2 (Rib)	4.79	m	COSY(4.44;6.11) TOCSY(4.28)
173	β -Ribopyranose	—	CH-1	4.88	m	COSY(3.81) TOCSY(3.92) HSQC(96.08)
174	α -Ribopyranose	—	CH-1	4.92	—	COSY(3.51) TOCSY(4.11) HSQC(96.46)
175	α-Mannose	α-Man	CH-1	5.18	d:3.95	COSY(3.94) HSQC(96.64)
176	α-Glucose	α-Glc	CH-1	5.24	d:3.70	COSY(3.54) TOCSY(3.43;3.72;3.84) HSQC(94.77)
177	β -Ribofuranose	—	CH-1	5.26	d	COSY(4.00) TOCSY(4.21) HSQC(103.80)
178	Fatty acid	FA	CH=CH	5.33	—	TOCSY(2.04;2.79)
179	α -Ribofuranose	—	CH-1	5.39	d	COSY(4.11) TOCSY(4.09) HSQC(99.04)
180	O-Acetylcarnitine	OACart	CH	5.63	m	COSY(3.90;2.65;2.51) TOCSY(3.62) HSQC(69.54)
181	Not identified E	NI-E	—	5.63	—	HSQC(100.10)
182	Uracil	U	CH-6	5.81	m	COSY(7.54) HSQC(103.72)
183	Uridine	Ud	CH	5.89	—	COSY(4.34)
184	Uridine	Ud	CH	5.92	—	COSY(7.91)
185	Uridine phosphate	UdP	CH	5.98	—	COSY(7.98)
186	Uridine phosphate	UdP	CH	5.99	—	COSY(4.33)
187	Inosine	Ino	CH-1 (Rib)	6.11	d	COSY(4.79) TOCSY(4.24;4.44)
188	Cytidine phosphate	CyP	CH	6.13	—	COSY(7.93)
189	Inosine 5'-phosphate	IMP	CH-1 (Rib)	6.16	d	COSY(4.77) TOCSY(4.51)
190	Fumaric acid	FuA	α,β CH=CH	6.53	s	HSQC(138.00)
191	Tyramine	Tyrm	CH-3,5	6.80	m	COSY(7.12) HSQC(118.10)
192	Tyrosine	Tyr	CH-3,5	6.89	d:8.16	COSY(7.19) HSQC(118.40)
193	Tyramine	Tyrm	CH-2,6	7.12	m	COSY(6.80) HSQC(133.00)
194	Tyrosine	Tyr	CH-2,6	7.19	d:8.16	COSY(6.89) HSQC(133.20)
195	Tryptophan	Trp	CH-6	7.19	—	COSY(7.73)
196	Carnosine	Car	CH-5 (His)	7.27	s	COSY(8.59) HSQC(119.60)
197	Anserine	Ans	CH-5 (His)	7.27	s	COSY(8.63) HSQC(121.10)
198	Tryptophan	Trp	CH-5	7.27	—	COSY(7.53) TOCSY(7.73)
199	Tryptophan	Trp	CH	7.30	s	¹ H; Bibliography
200	Phenylalanine	Phe	CH-2,6	7.32	m	COSY(7.42) HSQC(131.80)
201	Phenylalanine	Phe	CH-4	7.38	m	COSY(7.42) HSQC(130.30)
202	Phenylalanine	Phe	CH-3,5	7.42	m	COSY(7.32;7.38) HSQC(131.60)
203	Tryptophan	Trp	CH-7	7.53	—	COSY(7.27) TOCSY(7.19;7.73)
204	Uracil	U	CH-5	7.54	m	COSY(5.81) HSQC(146.30)
205	Nicotinic acid	NA	CH-5	7.60	dd	COSY(8.27;8.62) TOCSY(8.94) HSQC(126.70)
206	Tryptophan	Trp	CH-4	7.73	—	COSY(7.19) TOCSY(7.27;7.53)
207	Uridine	Ud	CH	7.91	—	COSY(5.89)
208	Cytidine phosphate	CyP	CH	7.93	—	COSY(6.13)
209	Uridine phosphate	UdP	CH	7.98	—	COSY(5.98)
210	Xanthine	Xan	CH	7.99	s	HSQC(143.9)
211	Hypoxanthine	Hx	CH-8	8.19	s	HSQC(148.02)
212	Hypoxanthine	Hx	CH-2	8.21	s	HSQC(144.39)
213	Inosine 5'-phosphate	IMP	CH-8	8.25	s	¹ H; Bibliography
214	Inosine	Ino	CH-8 (Purin)	8.24	s	¹ H; HSQC(148.90)
215	ATP/ADP/AMP	AXP	CH-8	8.25	s	¹ H; Bibliography
216	Nicotinic acid	NA	CH-4	8.27	d	COSY(7.60) TOCSY(8.72;8.94) HSQC(140.50)
217	Not identified F	NI-F	—	8.30	—	HSQC(137.00)
218	Not identified G	NI-G	—	8.37	—	HSQC(136.80)
219	Inosine	Ino	CH-3 (Purin)	8.37	s	¹ H; HSQC(139.60)
220	Formic acid	FoA	CH	8.46	s	HSQC(173.70)
221	ATP/ADP/AMP	AXP	CH-2	8.49	s	¹ H; Bibliography

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Peak	Compound	Abbreviation	Group	¹ H(ppm)	Mult.:J(Hz)	Assignment data
222	Inosine 5'-phosphate	IMP	CH-2	8.51	s	¹ H; Bibliography
223	Carnosine	Car	CH-2 (His)	8.59	s	COSY(7.27) HSQC(136.20)
224	Anserine	Ans	CH-2 (His)	8.63	s	COSY(7.27) TOCSY(3.87) HSQC(138.00)
225	Nicotinic acid	NA	CH-6	8.62	d	COSY(7.60) TOCSY(8.27;8.94) HSQC(152.80)
226	Nicotinic acid	NA	CH-2	8.94	s	TOCSY(8.62;8.27;7.60) HSQC(151.40)

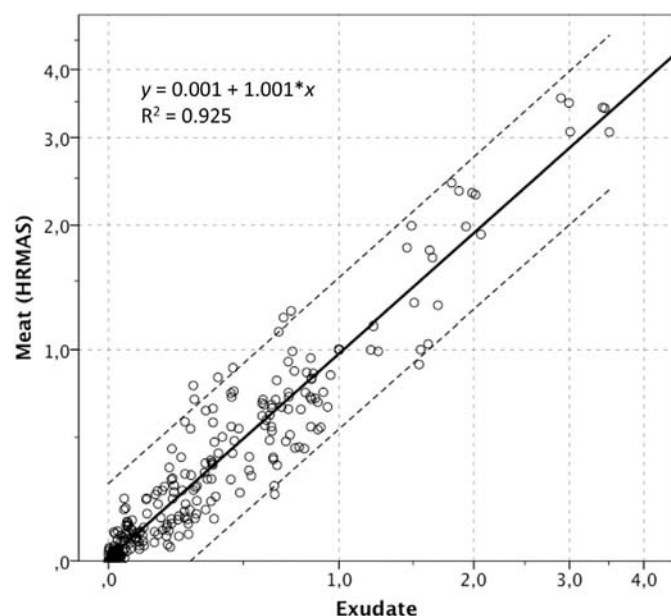


Fig. 2. Relationship between meat and exudate spectra. Experimental points represent buckets from 6 different samples whose meat and exudate spectra were both recorded, thus providing a pair of relative intensity values for each bucket. Therefore 6×48 pairs of relative buckets intensities are plotted (number of samples \times number of buckets, after excluding those at 2.35, 2.07, 1.33, 1.20, and 0.89 ppm, due to the presence of FA contributions in the HRMAS spectra). Logarithmic scales were employed in both axes for the only purpose of representation, thus allowing a better visualization of the spread of data. The thick solid line shows the linear regression fit of meat relative buckets intensities to those of exudates. The equation of the regression line as well as the goodness of the fitting are specified. Dashed lines represent the upper and lower limits of the 99% confidence interval for predictions.

aging are shown in Table 2. Significant differences between both groups have been found. Group 1 (storage < 2 weeks) was characterized by high levels of IMP, Ino, α , β -Glc, α -Man, Gln and the miscellaneous buckets at 3.78, 3.72, 3.51 and 3.42 ppm, all of them largely influenced by the sugar backbone. These levels decrease with aging. Samples from Group 2 (storage > 2 weeks) exhibited increased levels of FA, Tyr, Tyrm, GABA, Glu, α -Ala, 3-HBA, 2,3-Butanediol, Val, Ile, Leu, and BA.

Fig. 4 illustrates, in terms of spectral peak variations, the main metabolic changes that can be detected in exudate spectra due to meat aging. The expanded spectral regions (A to E) in this Fig. include the signals of the metabolites with the largest variations between groups (Table 2). Regarding nucleotides, regions A and B show the well known storage degradation pathway which goes from ATP/ADP to uric acid through AMP, IMP, Ino, Hx and Xan [26]. Hence, signals from IMP, Ino and Hx are observed at 3 post-mortem days. After 12 days IMP is not longer detected, and at day 24 only Hx signals are present. As for carbohydrates, the signals from anomeric protons (regions C and D of Fig. 4) are indicated for α , β -Glc and α -Man. These signals decrease during storage until they disappear. This evolution, related to flesh degradation after slaughter [26–28], can be stopped by irradiation, supporting a microbial origin for the degradation [27]. On the contrary to these observations, Graham et al. [3] reported an increase in sugars during storage, but these results cannot be compared with those reported here, since these authors did not study the anomeric region but the 3.50–3.62 ppm one, in which many other metabolites overlap carbohydrate signals.

E region in Fig. 4 includes Gln, Glu, and GABA signals, so is very useful to follow the generation of GABA from Gln and Glu during storage [29,30]. As can be seen in the Fig., the rapid increase in GABA levels is parallel to the decrease in Gln levels. A similar fact was already reported by our group during storage of salmon samples [26]. Nowadays, there is a boom in GABA enriched foods [31], giving special relevance to this ability of NMR to monitor GABA

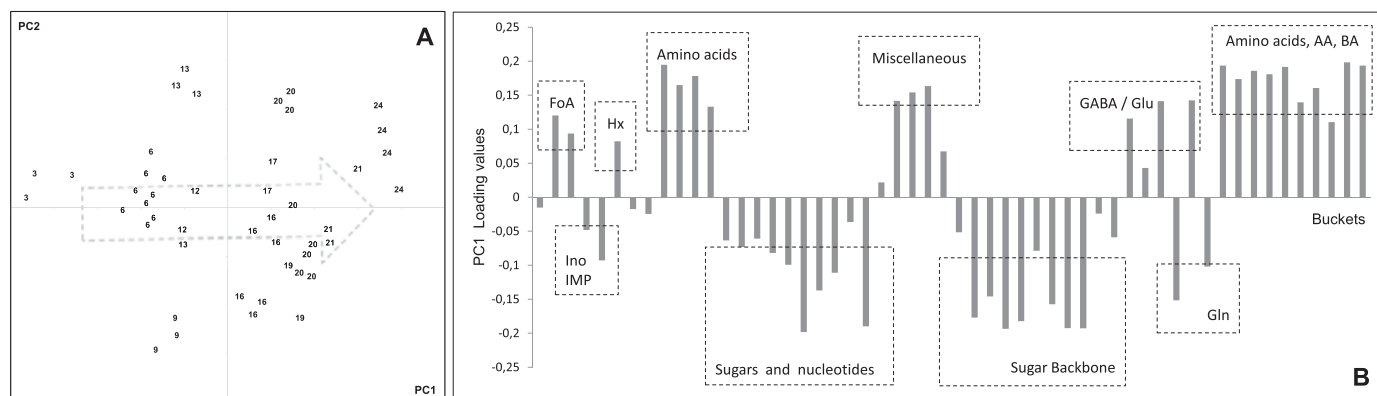


Fig. 3. Principal Components Analysis of beef exudates: (A) Scores plot of PC1 versus PC2. Each data point corresponds to one beef exudate sample, which is represented on the graph by a number expressing the post-mortem day of the respective meat sample. Though it is evident that both PCs exhibit clustering potential, the most noticeable fact was the ability of PC1 to order (left to right) exudates according to their corresponding postmortem day. The arrow follows the aging tendency line obtained by linear regression of the scores averages calculated for each postmortem day group. (B) Loadings plot of PC1. Buckets are grouped according to the main metabolites that they represent.

Table 2

Statistically significant ($p < 0.0003$) buckets to discriminate between exudates from fresh (Group 1: <2 weeks storage time) and aged (Group 2: >2 weeks storage time) meat samples (Goodpaster, Romick-Rosendale and Kennedy 2010). Variations reported in the third column were calculated for each bucket as $(\langle G2 \rangle - \langle G1 \rangle) * 100 / \langle G1 \rangle$, being $\langle G1 \rangle$ and $\langle G2 \rangle$ the average intensity of the bucket in Group 1 or Group 2, respectively. Upwards or downwards arrows indicate either positive or negative variations, while the number of arrow symbols indicates the intensity of the variation (one arrow, up to $\pm 50\%$; two arrows, in the $\pm (50-100\%)$ range; three arrows, $> 100\%$ or 0).

Bucket (ppm)	Main metabolites	Variation
8.45	Formic acid	↑↑↑
7.38	Phe + Trp	↑↑
6.90	Tyr	↑↑
6.80	Tyrm	↑↑
6.16	IMP	↓↓↓
5.24	α -Glc	↓↓↓
5.19	α -Man	↓↓↓
4.66	β -Glc	↓↓
4.29	Ino	↓↓
3.89	Ino + β -Glc	↓↓
3.78	Gln + Glu + α -Glc	↓
3.72	α , β -Glc + 2,3-butanediol	↓↓
3.51	α , β -Glc	↓↓
3.42	α , β -Glc	↓
2.35	Glu + GABA + 3-HBA	↑↑↑
2.07	Glu	↑↑
1.93	AA + GABA	↑↑↑
1.57	2-HBA + BA	↑↑↑
1.48	α -Ala + Lys + Ile	↑
1.20	3-HBA + EtOH	↑↑
1.14	2, 3-Butanediol + IBA	↑↑
1.01	Val + Ileu + Leu + 2-HBA	↑↑↑
0.89	BA	↑↑↑

evolution with meat aging. Finally, AA singlet could also be observed in region E, where it increases with aging, which has been associated with bacterial degradation of carbohydrates and lactate [32].

Furthermore, the significantly increased levels of free amino acids (Phe, Tyr, Ala, Val, Ile and Leu) after 2 weeks storage (Table 2) can be explained by accumulated proteolysis, which starts after slaughtering [5,24]. Tyrm and FoA also increase during meat storage, and has previously been associated with bacterial spoilage induction during autolysis [32,33]. On the other hand, aging increased BA levels can be correlated with lipid hydrolysis that produces free FA, the autoxidation of which results in short chain FA accumulation [34].

In summary, different processes that happen simultaneously during meat aging can be monitored through the analysis of exudates. This can, therefore, be considered a good material from which to obtain valuable information about the composition and the situation of a meat sample during storage. Furthermore, the use of multivariate statistical techniques has shown how individual meat exudates, with non obvious differences among them in the spectroscopic space, can however be PCA classified according to their postmortem time. Hence, after PCA, it was possible to transform the original 54 dimensional spectroscopic space into a 2 dimensional subspace spanned by the two first principal components (PC1 and PC2), which together explain more than 50% of the variance. In particular, PC1 appeared mostly related to meat aging, in other words: the older the meat sample, the higher its PC1 score.

Fig. 3B shows the loadings plot of PC1. Buckets with positive loading values will be those that help to increase PC1 scores (i.e., long storage time), and vice versa, buckets with negative loadings will decrease PC1 scores, therefore being more related to meat freshness. The main metabolites associated with the different groups of buckets are specified in the Fig. In general terms, nucleotides, sugars or Gln are mostly related to meat freshness, whereas amino acids or AA are more related to meat aging. As expected, there is a close relationship between the results in this Fig. and those derived from the significance analysis in Table 2.

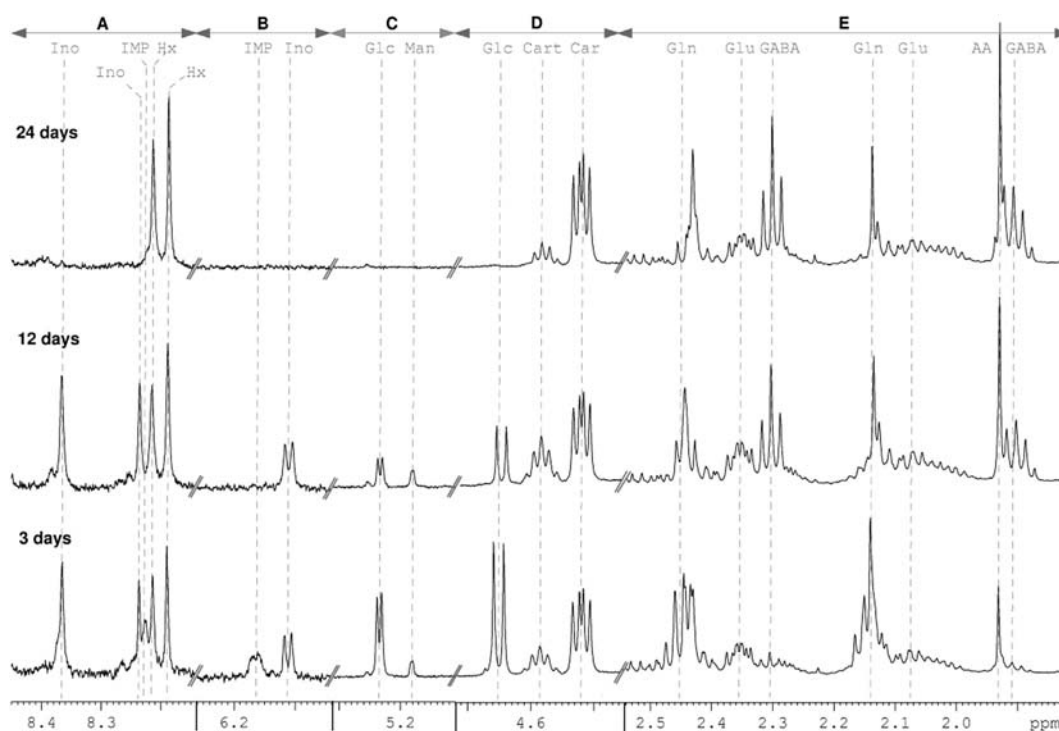


Fig. 4. Expanded regions of beef exudates ^1H spectra at 3, 12 and 24 postmortem days. The graph shows the evolution of nucleotides (IMP, Ino and Hx) (A, B), degradation of sugars (α , β -Glc and α -Man) (C, D), and transformation of Gln to Glu and then to GABA as well as AA increase (E), all of them involved in meat aging processes.

3.4. Predicting meat aging by exudate NMR analysis

PCA results evidenced that the first principal component was closely related to sample aging. Thus, the most remarkable fact of Fig. 3A is how well the exudate samples were arranged along the direction of PC1 according to meat aging time. From this close correlation one would expect to be able to predict the age of an exudate sample just by knowing its position along the PC1 axis. In order to exploit this prediction potential, we performed a multivariate analysis that took into account not only the bucket matrix (X table), but a secondary one—column matrix (Y table) containing the aging times of each sample, thus allowing the best correlation between both tables to be calculated. In short, we performed a PLS analysis looking for components or factors that, unlike PCA, explained not most of the variance in the X table, but the part of that variance that best fitted the data from the Y table. For this PLS analysis, we chose the least number of factors (i.e. 4) whose residuals were not significantly greater than those of the PLS model with minimum root mean square error (i.e. 9) [20]. In this way, we reduced the influence of noise in our PLS model, thus improving its prediction capability. Thus, the coefficients of determination, R^2 , of the regression lines that fitted predicted versus real postmortem days for each of our cross-validation test sets were in all cases higher than 0.95 (Fig. S8). In spite of the commercial origin and, therefore, heterogeneity of our whole dataset (samples from different cattle and breed), an acceptable value of 1.6 days was obtained as prediction error (RMSEP) of our 4-factors PLS model, thus reinforcing the predictive potential of NMR based exudate analysis.

4. Conclusions

As far as we know, this is the first NMR study of meat exudates. This work verifies that a meat exudate is a natural extract that provides important metabolic information of the meat piece from which it proceeds. This statement has been proven by the strong correlation found between exudate and meat spectra. Working with these representative exudates we have been able to identify a greater number of metabolites than previously reported for meat. Furthermore, metabolic profile changes associated with meat aging were easily monitored by recording exudate spectra. The results herein reported suggest that, working with exudates, the use of NMR in combination with multivariate analysis techniques can have a great potential for both classifying meat samples according to their storage time (PCA) and, after proper calibration, predicting their aging time (PLS).

We suggest that, like meat aging, quality and safety meat control could benefit from ^1H NMR profiling of meat exudates. In order to extend the use of NMR based metabolomics of meat exudates, either for meat aging evaluation, as performed in this report, or for new application fields (i.e., conservation, effects of processing, authenticity of meat mixtures), future work should be aimed at building robust meat exudate databases.

Acknowledgment

This work was supported by grants AGL2010-19158 and CTQ2010-14936 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The authors gratefully acknowledge the members of the CAI of NMR and RSE of the Complutense University for their cooperative collaboration, with special mention to Palmira Villa.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.032>.

References

- [1] Y. Jung, J. Lee, J. Kwon, K. Lee, D.H. Ryu, G. Hwang, Discrimination of the geographical origin of beef by ^1H NMR-based metabolomics, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 10458–10466.
- [2] L. Mannina, A.P. Sobolev, S. Viel, Liquid state ^1H high field NMR in food analysis, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 66 (2012) 1–39.
- [3] S.F. Graham, T. Kennedy, O. Chevallier, A. Gordon, L. Farmer, C. Elliott, B. Moss, The application of NMR to study changes in polar metabolite concentrations in beef longissimus dorsi stored for different periods post mortem, *Metabolomics* 6 (2010) 395–404.
- [4] C. Liu, D. Pan, Y. Ye, J. Cao, ^1H NMR and multivariate data analysis of the relationship between the age and quality of duck meat, *Food Chem.* 141 (2013) 1281–1286.
- [5] G. Koutsidis, J.S. Elmore, M.J. Oruna-Concha, M.M. Campo, J.D. Wood, D.S. Mottram, Water-soluble precursors of beef flavour. Part II: effect of post-mortem conditioning, *Meat Sci.* 79 (2008) 124–130.
- [6] M. Ritota, L. Casciani, S. Failla, M. Valentini, HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterization, *Meat Sci.* 92 (2012) 754–761.
- [7] L. Shintu, S. Caldarelli, B.M. Franke, Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy, *Meat Sci.* 76 (2007) 700–707.
- [8] E. Zanardi, A. Caligiani, L. Palla, M. Mariani, S. Ghidini, P.A. Di Ciccio, G. Palla, A. Ianieri, Metabolic profiling by ^1H -NMR of ground beef irradiated at different irradiation doses, *Meat Sci.* 103 (2015) 83–89.
- [9] W. Jakes, A. Gerdova, M. Defernez, A.D. Watson, C. McCallum, E. Limer, I.J. Colquhoun, D.C. Williamson, E.K. Kemsley, Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz ^1H NMR spectroscopy, *Food Chem.* 175 (2015) 1–9.
- [10] I.K. Straadt, M.D. Aaslyng, H.C. Bertram, An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception, *Meat Sci.* 96 (2014) 719–728.
- [11] D. Sacco, M.A. Brescia, A. Buccolieri, A. Caputi Jambrenghi, Geographical origin and breed discrimination of Apulian lamb meat samples by means of analytical and spectroscopic determinations, *Meat Sci.* 71 (2005) 542–548.
- [12] S.F. Graham, D. Farrell, T. Kennedy, A. Gordon, L. Farmer, C. Elliott, B. Moss, Comparing GC–MS, HPLC and ^1H NMR analysis of beef longissimus dorsi tissue extracts to determine the effect of suspension technique and ageing, *Food Chem.* 134 (2012) 1633–1639.
- [13] G. Offer, Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis, *Meat Sci.* 30 (1991) 157–184.
- [14] K.O. Honikel, Water-holding capacity of meat, in: M.F.W. te Pas, M.E. Everts, H.P. Haagsman (Eds.), *Muscle Development of Livestock Animals: Physiology, Genetics and Meat Quality*, CABI Publishing, Cambridge, 2004, pp. 389–400.
- [15] G. Otto, R. Roehe, H. Looft, L. Thielking, P.W. Knap, M.F. Rothschild, G.S. Plastow, E. Kalm, Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss, *Meat Sci.* 75 (2007) 185–195.
- [16] A.W.J. Savage, P.D. Warriss, P.D. Jolley, The amount and composition of the proteins in drip from stored pig meat, *Meat Sci.* 27 (1990) 289–303.
- [17] G. Kim, E. Jung, H. Lim, H. Yang, S. Joo, J. Jeong, Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork, *Meat Sci.* 95 (2013) 323–329.
- [18] A. Di Luca, A.M. Mullen, G. Elia, G. Davey, R.M. Hamill, Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity, *Meat Sci.* 88 (2011) 261–270.
- [19] A.M. Goodpaster, L.E. Romick-Rosendale, M.A. Kennedy, Statistical significance analysis of nuclear magnetic resonance-based metabolomics data, *Anal. Biochem.* 401 (2010) 134–143.
- [20] H. van der Voet, Comparing the predictive accuracy of models using a simple randomization test, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 25 (1994) 313–323.
- [21] P.G. Peiretti, C. Medana, S. Visentin, V. Giancotti, V. Zunino, G. Meineri, Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thio-barbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species, *Food Chem.* 126 (2011) 1939–1947.
- [22] F. Toldrá, M. Aristoy, M. Flores, Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham, *Food Res. Int.* 33 (2000) 181–185.
- [23] D. Castejón, I. Mateos-Aparicio, M.D. Molero, M.I. Cambero, A. Herrera, Evaluation and optimization of the analysis of fatty acid types in edible oils by ^1H -NMR, *Food Anal. Methods* 7 (2014) 1285–1297.
- [24] G. Koutsidis, J.S. Elmore, M.J. Oruna-Concha, M.M. Campo, J.D. Wood, D.S. Mottram, Water-soluble precursors of beef flavour: I. Effect of diet and breed, *Meat Sci.* 79 (2008) 270–277.
- [25] Q.N. Van, G.N. Chmurny, T.D. Veenstra, The depletion of protein signals in metabolomics analysis with the WET–CPMG pulse sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2003) 952–959.
- [26] D. Castejón, P. Villa, M.M. Calvo, G. Santa-Maria, M. Herraiz, A. Herrera, ^1H -HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Magn. Reson. Chem.* 48 (2010) 693–703.
- [27] P. Villa, D. Castejón, M. Herraiz, A. Herrera, ^1H -HRMAS NMR study of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) treated with E-beam, *Magn. Reson. Chem.* 51 (2013) 350–357.
- [28] M. Aliani, L.J. Farmer, J.T. Kennedy, B.W. Moss, A. Gordon, Post-slaughter changes in ATP metabolites, reducing and phosphorylated sugars in chicken meat, *Meat Sci.* 94 (2013) 55–62.

- [29] H. Li, Y. Cao, Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid, *Amino Acids* 39 (2010) 1107–1116.
- [30] R. Dhakal, V.K. Bajpai, K. Baek, Production of gaba (γ – aminobutyric acid) by microorganisms: a review, *Braz. J. Microbiol.* 43 (2012) 1230–1241.
- [31] B. Lee, J. Kim, Y.M. Kang, J. Lim, Y. Kim, M. Lee, M. Jeong, C. Ahn, J. Je, Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods, *Food Chem.* 122 (2010) 271–276.
- [32] G.E. Nychas, P.N. Skandamis, C.C. Tassou, K.P. Koutsoumanis, Meat spoilage during distribution, *Meat Sci.* 78 (2008) 77–89.
- [33] V. Müller, Bacterial Fermentation in *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Chichester, 2008, pp. 1–8.
- [34] C. Alasnier, A. Meynier, M. Viau, G. Gandemer, Hydrolytic, Oxidative, Changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage, *J. Food Sci.* 65 (2000) 9–14.

SUPPLEMENTARY DATA

(13 pages)

Manuscript entitled: **Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging**

David Castejón, Juan Manuel García-Segura, Rosa Escudero, Antonio Herrera,
María Isabel Cambero

Table of contents

1) Section S1. Materials and methods of 2D HRMAS analysis	p 2.
2) Section S2. Main assignments of the new metabolites identified	p.3.
3) Table S1. Variable buckets used for the multivariate data analysis	p.4.
4) Table S2. General NMR assignment of lipid signals in the ^1H -NMR spectra.....	p.5.
5) Fig. S1. ^1H , ^1H TOCSY spectrum from aliphatic region (0.6-4.7 ppm)	p.6.
6) Fig. S2. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from aliphatic-A region (0.8-2.8 ppm)	p.7.
7) Fig. S3. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from aliphatic-B region (2.8-4.7 ppm).....	p.8.
8) Fig. S4. ^1H , ^1H TOCSY spectrum from anomeric sugar region (4.2-6.3 ppm)	p.9.
9) Fig. S5. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from anomeric sugar region (4.6-5.8 ppm)	p.10.
10) Fig. S6. ^1H , ^1H TOCSY spectrum from aromatic region (5.7-9.1 ppm)	p.11.
11) Fig. S7. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from aromatic region (6.8-9.1 ppm)	p.12.
12) Fig. S8. Predicted versus real postmortem days for a testing set.....	p.13.

1) Section S1 - Materials and methods of 2D HRMAS analysis.

^1H - ^1H COSY-HRMAS: These experiments were acquired under the following conditions: water presaturation during 1 s relaxation delay, a spectral width of 8333 Hz in both dimensions, 2k data points in f2 and 384 increments in f1, averaged over 128 acquisitions. An unshifted sinusoidal window function was applied in both dimensions and zero filling in f1 dimension.

^1H - ^1H TOCSY-HRMAS: These experiments were recorded with water presaturation for a 1-s relaxation delay, a spectral width of 8333 Hz in both dimensions, a 70 ms mixing time, 2k data points in f2 and 384 increments in f1, averaged over 128 acquisitions. Zero filling in f1 and unshifted squared sinusoidal window function in both dimensions were applied before Fourier transformation.

2) Section S2 - Main assignments of the new metabolites identified.

Metabolite assignments were based on analyses of 2D NMR spectra COSY, TOCSY, HMQC and HMBC. These spectra are shown in Fig. S1 to S7. Fig. S1 to S3 include the exudates TOCSY and HSQC spectra, which corresponds to the aliphatic region. Anomeric sugar region have been shown in the TOCSY (Fig.S4) and HSQC (Fig.S5) 2D spectra. Finally aromatic regions were included in Fig. S6 (TOCSY) and Fig. S7 (HSQC). According to their nature, the new identified metabolites were distributed in the following groups:

Amino Acids, Peptides and Analogues. β -Ala (signals 65 and 83 in Table 1) and GSH (48, 64, 75, 130 and 168) were assigned based on the homonuclear correlations in TOCSY spectrum (Fig.S1). Aromatic signals for Trp (195, 198, 199, 203 and 206) and Tyrm (191 and 193) were also identified by the correlations in the TOCSY spectrum (Fig.S6). Singlets at 3.27 (94) and 3.92 ppm (141) were assigned to Bet, see Fig.1. These assignments were confirmed by their correlations in the HSQC spectrum (Fig.S3). In aging samples the pattern signals for GABA (signals 33, 53, 76 in Table 1) were also recognized.

Carbohydrates and Carbohydrates Conjugates. Fig. 1 contains the Glycerol signals (108, 115 and 128 in Table 1). The main corresponding correlations from α,β -Ribopyranose (signals 131, 173 and 174) and α,β -Ribofuranose (146, 151, 177 and 179) were found in the TOCSY and HSQC spectra (Fig.S4 and S5).

Organic Acids and Derivates. Singlet at $\delta = 2.42$ ppm was assigned to SA (signal 58 in Fig. 1). The characteristic doublets from CA at 2.54 (signal 63) and 2.68 ppm (signal 69) were assigned through the appropriate cross-peak in 2D spectra (Fig.S1). The structure from OACart was easily assigned through the multiplet at 5.63 ppm (signal 180 in Fig.1) and all of its homonuclear correlations in the TOCSY spectrum (see Fig.S4).

Nucleosides, Nucleotides and Analogues. Reported signals from Ud (160 and 184), UdP (159, 185, 186 and 209), CyP (188 and 208) and U (108 and 204), could be identified from their specific cross-peaks in TOCSY spectrum (Fig.S4 and S6).

Miscellaneous. Singlet at 2.22 ppm was assigned to Acetone (signal 50 in Fig.1). Its presence was confirmed by the HSQC spectrum (see Fig.S3). Also characteristic signals from 2,3-Butanediol (11 and 12), PCho (85) and GPCho (158) are included in Fig.1. Crn signals in Table 1 (79 and 149) were confirmed by the HSQC experiment (see Fig S3).

3) Table S1. Variable buckets used for the multivariate data analysis.

The table includes the middle point of the variable buckets and its width.

	Bucket	Width		Bucket	Width
1	8.98	0.15	28	3.95	0.05
2	8.57	0.20	29	3.89	0.02
3	8.45	0.04	30	3.86	0.04
4	8.37	0.05	31	3.78	0.07
5	8.24	0.03	32	3.72	0.07
6	8.19	0.07	33	3.64	0.08
7	7.99	0.05	34	3.57	0.06
8	7.60	0.21	35	3.51	0.07
9	7.38	0.15	36	3.42	0.10
10	7.23	0.14	37	3.35	0.05
11	6.90	0.08	38	3.24	0.14
12	6.80	0.12	39	3.10	0.19
13	6.53	0.04	40	2.90	0.06
14	6.16	0.06	41	2.70	0.18
15	6.11	0.05	42	2.48	0.14
16	5.64	0.13	43	2.35	0.13
17	5.46	0.05	44	2.14	0.05
18	5.24	0.06	45	2.07	0.08
19	5.19	0.05	46	1.93	0.13
20	4.91	0.04	47	1.81	0.05
21	4.78	0.05	48	1.57	0.10
22	4.66	0.07	49	1.48	0.08
23	4.59	0.07	50	1.33	0.14
24	4.51	0.08	51	1.20	0.06
25	4.42	0.10	52	1.14	0.06
26	4.29	0.17	53	1.01	0.15
27	4.13	0.13	54	0.89	0.07

4) Table S2. General NMR assignment of lipid signals in the ^1H -NMR spectra

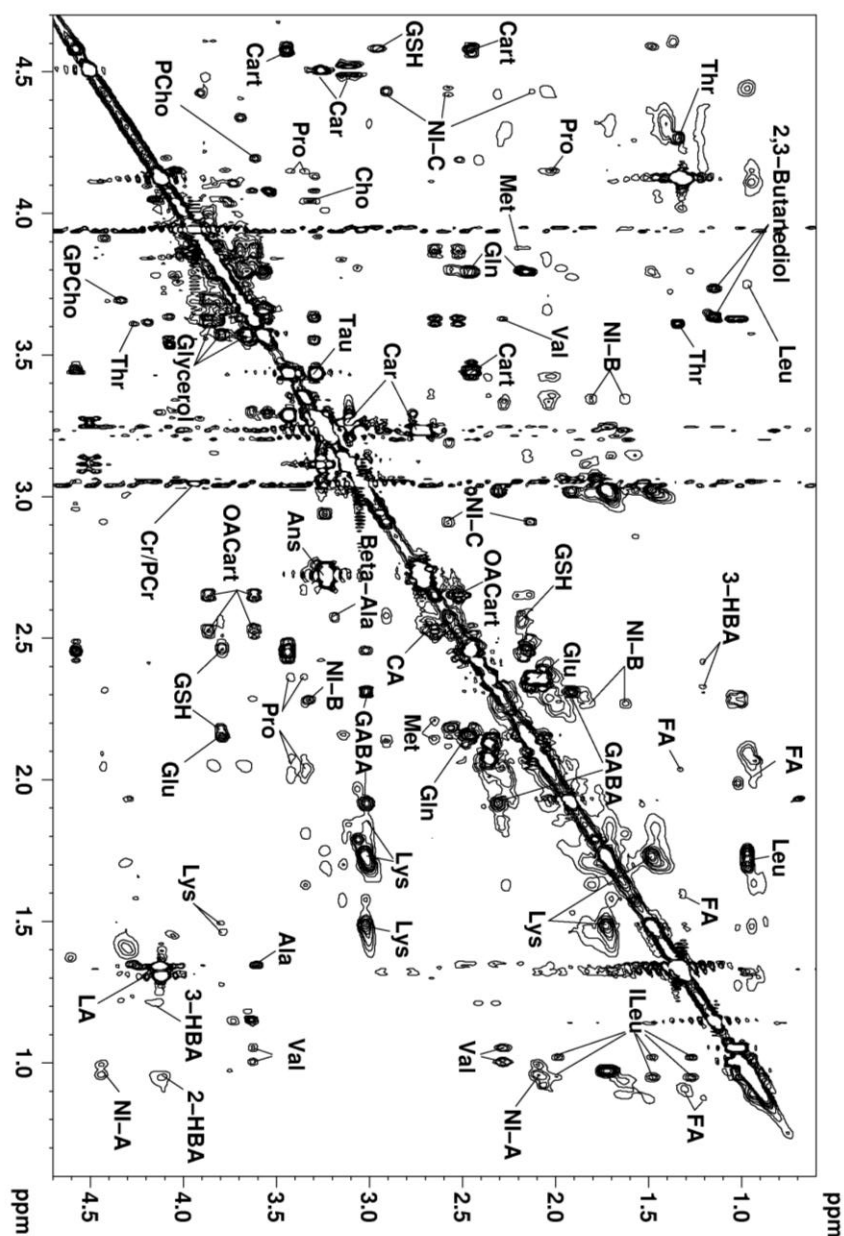
Table includes the peak notation shown in Fig. 1A. According to Castejón et al. (Castejón et al., 2014)¹, the table also includes signals from long chain Polyunsaturated Fatty Acids, denoted with asterisk, that were not detected in the ^1H -NMR spectra of beef muscle.

δ (ppm)	Assignment	Proton	Peak Notation
0.88	Fatty Acids (FA)	CH₃	A
0.97	Fatty Acids (FA)*	CH=CH-CH ₂ - CH₃	B
1.29	Fatty Acids (FA)	(CH₂)_n	C
1.61	Fatty Acids (FA)	CH ₂ - CH₂ -CH ₂ -COOR	D
2.01	Unsaturated FA	(CH ₂) _n - CH₂ -CH=CH- CH₂ -(CH ₂) _n	E
2.27	Fatty Acids (FA)	CH ₂ - CH₂ -COOR	F
2.76	Polyunsaturated FA*	CH=CH- CH₂ -CH=CH- CH₂ -CH=CH	G
4.12	Triglycerides (TG)	CH₂-α	H
4.31	Triglycerides (TG)	CH₂-α'	H
5.25	Triglycerides (TG)	CH-β	I
5.35	Unsaturated FA	CH=CH	J

¹ D. Castejón, I. Mateos-Aparicio, M.D. Molero, M.I. Cambero, A. Herrera, Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by ^1H -NMR, Food Analytical Methods 7 (2014) 1285-1297.

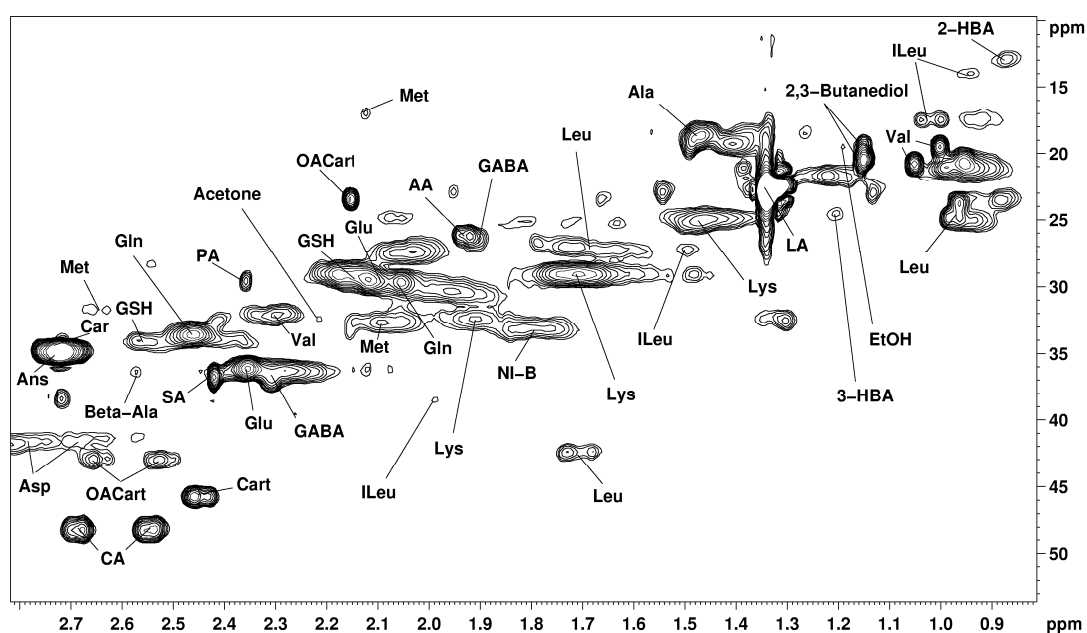
5) Fig. S1. ^1H , ^1H TOCSY spectrum from aliphatic region (0.6- 4.7ppm)

Representative aliphatic region of the ^1H , ^1H TOCSY spectra of beef exudates. Fig. S1 shows the expansion of the region between 0.6 to 4.7 ppm. In the figure the main homonuclear correlations are identified according to Table 1.



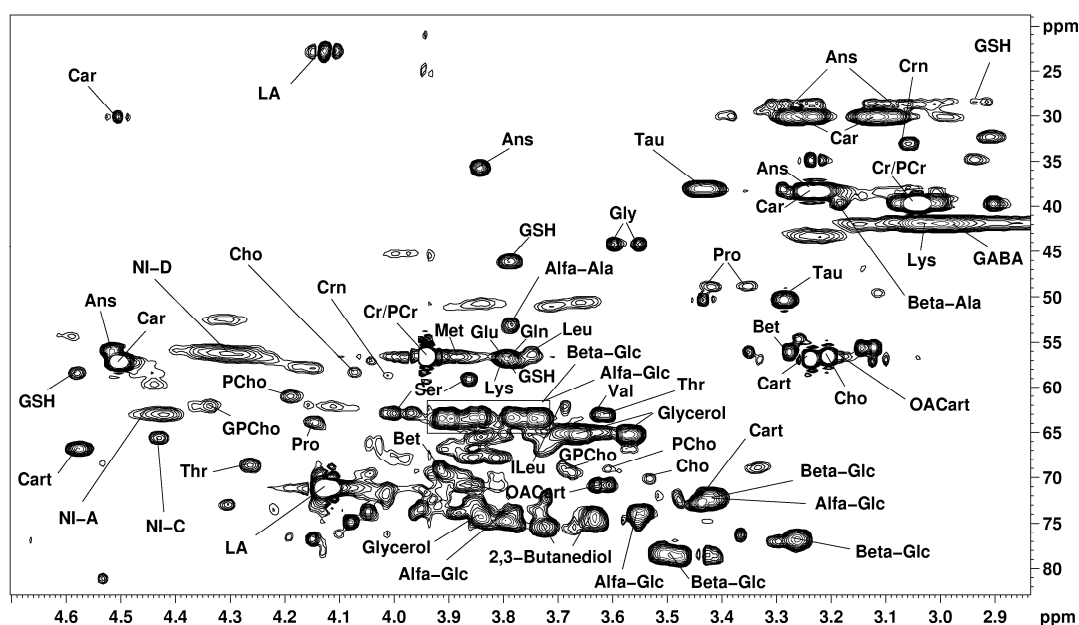
6) Fig. S2. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from aliphatic-A region (0.8-2.8 ppm)

Representative aliphatic-A regions of the ^1H , ^{13}C HSQC spectra of beef exudates. Fig. S2 shows the expansion of the region between 0.8 to 2.8 ppm. In the figure the main heteronuclear correlations are identified according to Table 1.



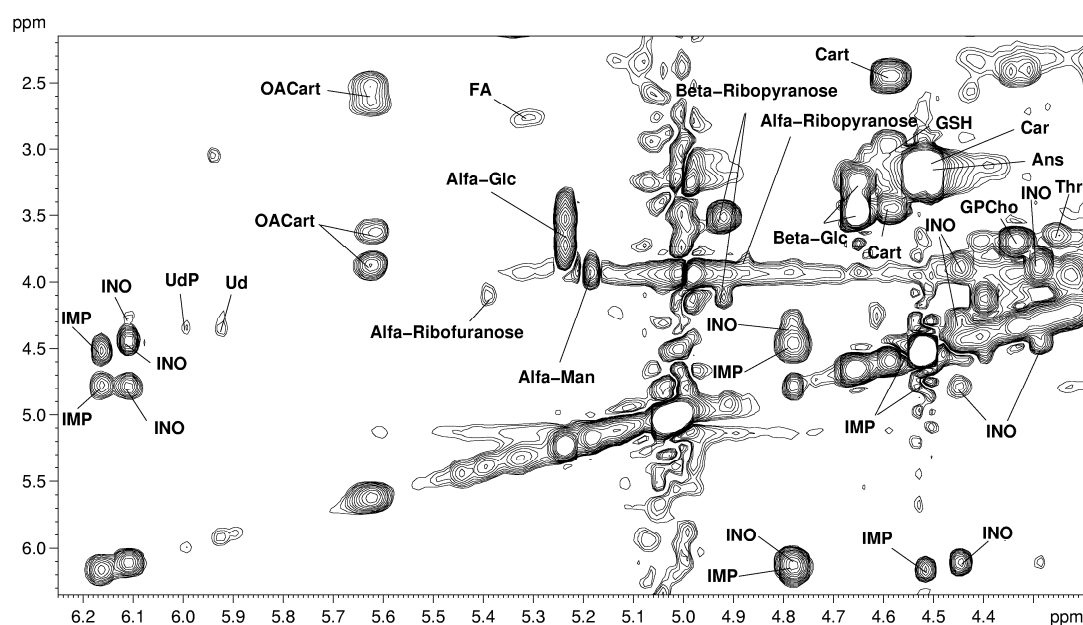
7) Fig. S3. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from aliphatic-B region (2.8-4.7ppm)

Representative aliphatic-B regions of the ^1H , ^{13}C HSQC spectra of beef exudates. Fig. S3 shows the expansion of the region between 2.8 to 4.7 ppm. In the figures the main heteronuclear correlations are identified according to Table 1



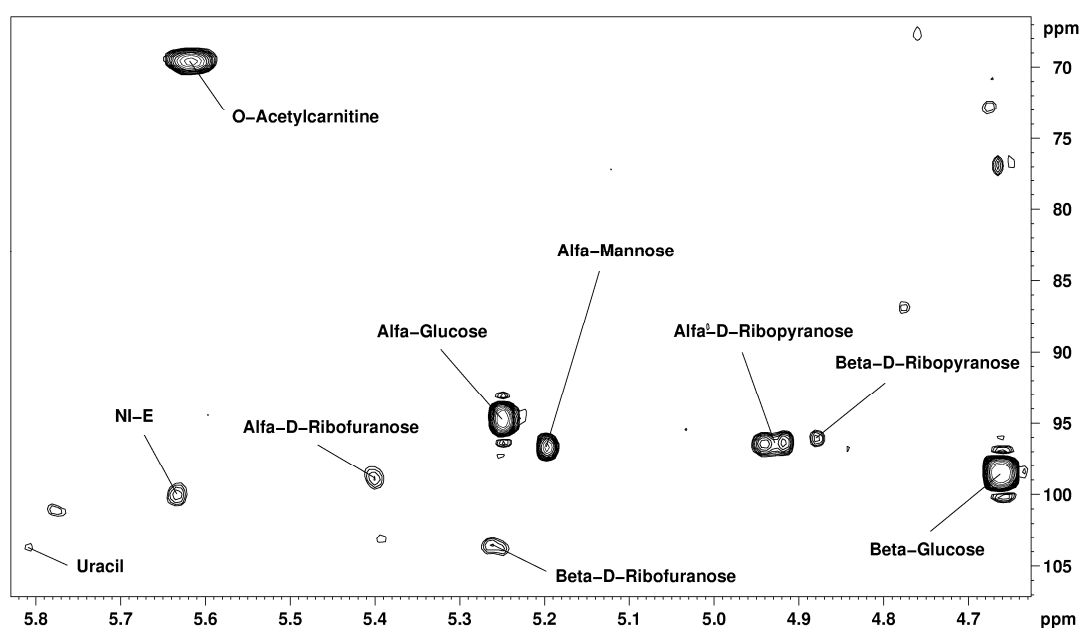
8) Fig. S4. ^1H , ^1H TOCSY spectrum from anomeric sugar region (4.2-6.3ppm)

Representative anomeric sugar region of the ^1H , ^1H TOCSY spectra of beef exudates. Fig. S4 shows the expansion of the region between 4.2 to 6.3 ppm. In the figure the main homonuclear correlations are identified according to Table 1.



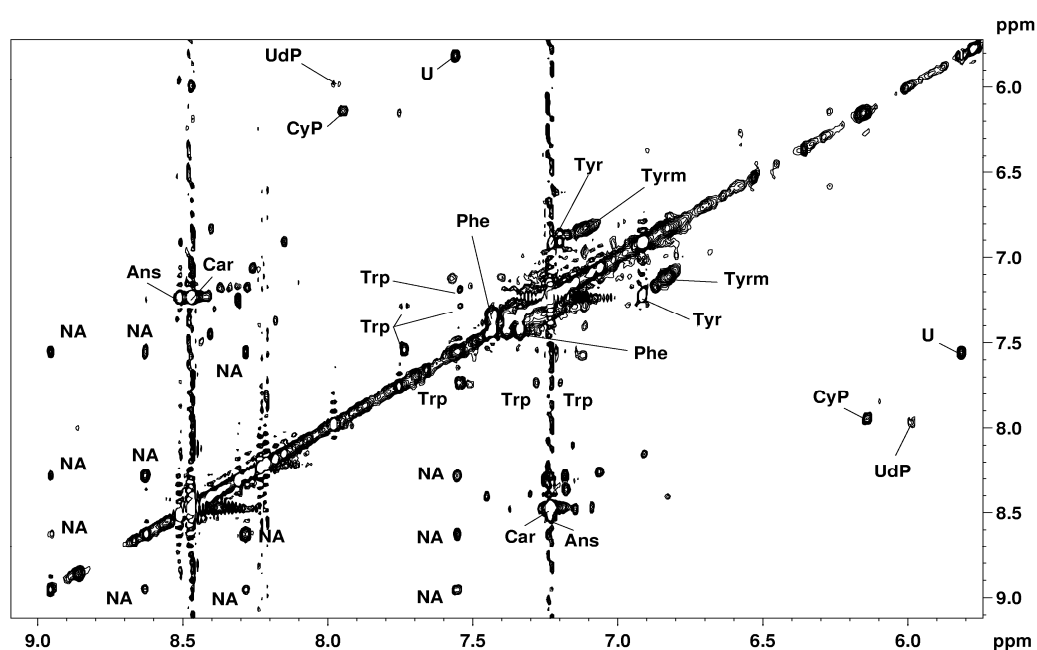
9) Fig. S5. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from anomeric sugar region (4.6-5.8ppm)

Representative anomeric sugar region of the ^1H , ^{13}C HSQC spectra of beef exudates. Fig. S5 shows the expansion of the region between 4.6 to 5.8 ppm. In the figure the main heteronuclear correlations are identified according to Table 1.



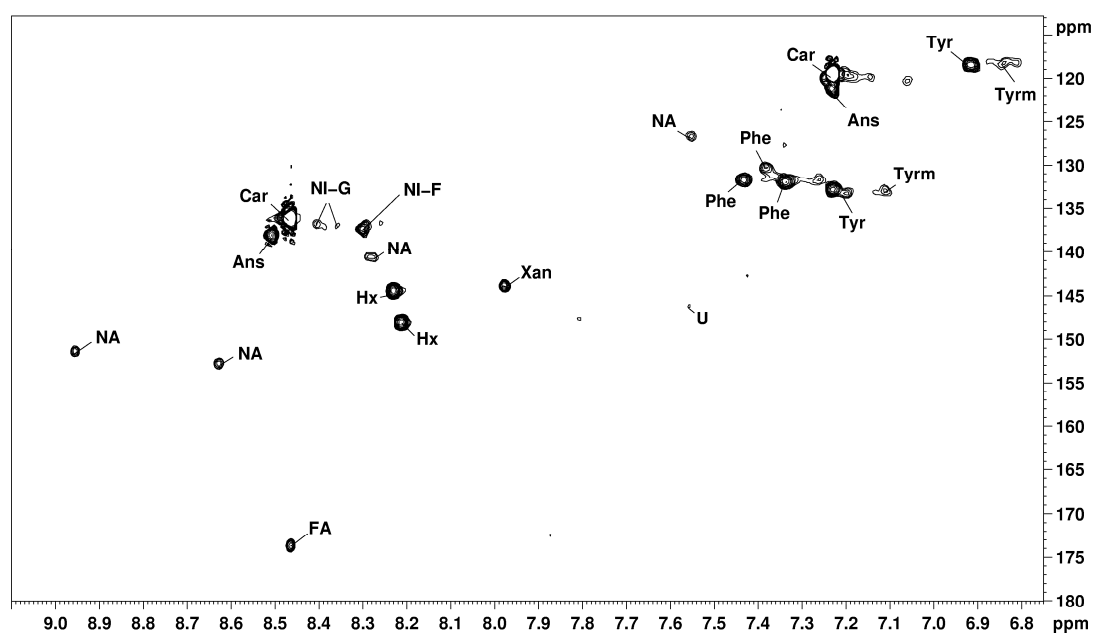
10) Fig. S6. ^1H , ^1H TOCSY spectrum from aromatic region (5.7-9.1ppm)

Representative aromatic region of the ^1H , ^1H TOCSY spectra of beef exudates. Fig. S6 shows the expansion of the region between 5.7 to 9.1 ppm. In the figure the main homonuclear correlations are identified according to Table 1.



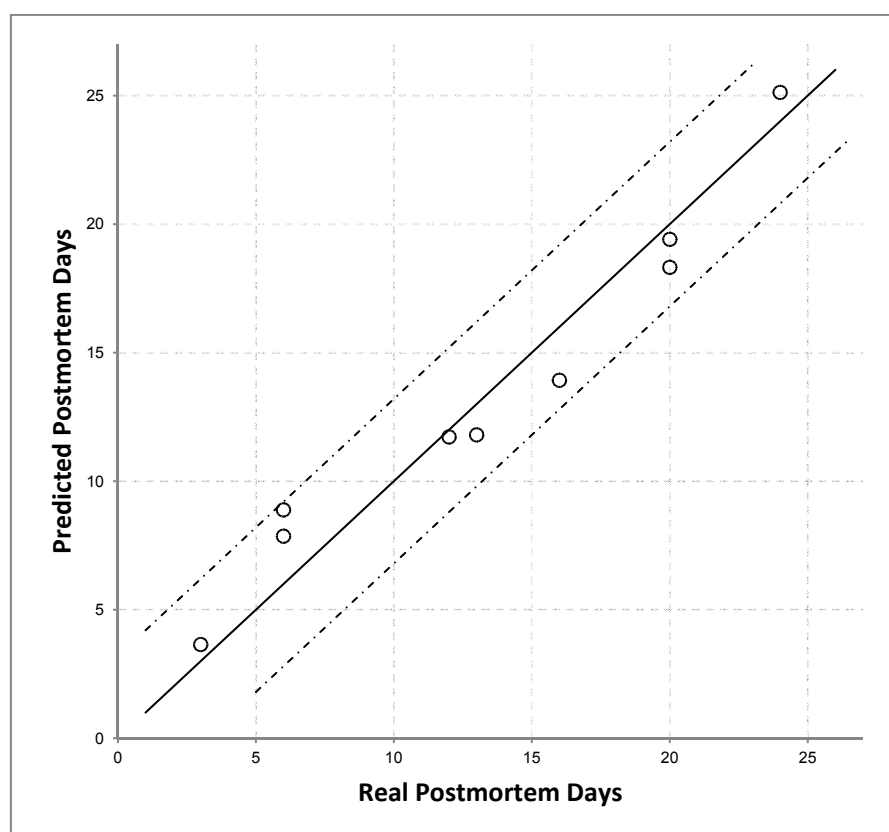
11) Fig. S7. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum from aromatic region (6.7-9.1ppm)

Representative aromatic region of the ^1H , ^{13}C HSQC spectra of beef exudates. Fig. S7 shows the expansion of the region between 6.7 to 9.1 ppm. In the figure the main heteronuclear correlations are identified according to Table 1.



12) Fig. S8. Predicted versus real postmortem days for a testing set.

Predicted versus real postmortem days for a testing set formed by 9 exudate samples obtained from meat pieces of known aging. PLS prediction was carried out with 4 factors, as this proved to be the most favorable choice with a view to reaching the minimum RMSEP. The minimum RMSEP value obtained after cross validation was 1.6. This value multiplied by two was used to define the upper and lower limits of the 95% confidence interval drawn with dashed lines.



IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Preámbulo.

Con el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha pretendido avanzar en la aplicación de la espectroscopía de RMN y del análisis metabolómico, en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Dentro de este área, se ha intentado profundizar en el potencial de la RMN en distintas vertientes: así, se han analizado alimentos de diferentes orígenes (vegetal y animal), diferente estado (sólido y líquido), tratando de evaluar y monitorizar diversos procesos (como la irradiación o el tratamiento térmico). En resumen, puede decirse que el objetivo global, en el planteamiento inicial de la Tesis, fue dar un paso más en el acercamiento de la RMN a la seguridad y control de los alimentos. Tras el análisis conjunto de los resultados obtenidos, consideramos que se han conseguido aportaciones tanto de interés científico como técnico. Por una parte, y respecto a los trabajos previos existentes en la bibliografía científica, se ha incrementado sustancialmente la asignación de señales a distintos componentes de los alimentos. Como avances en la aplicación de la RMN cabe destacar la optimización y automatización del análisis de aceites, y el empleo directo de matrices sólidas o de sustratos que no requieren manipulación o preparación alguna, como los exudados cárnicos. Todo ello se analiza en la presente discusión en cuatro apartados que se centran principalmente en: los avances de la RMN en el análisis de matrices alimentarias; la evaluación de diferentes aproximaciones en el abordaje de un análisis metabolómico; los avances en el análisis de RMN Metabolómica en varios procesos de envejecimiento, conservación y oxidación y el desarrollo de la automatización del análisis de alimentos mediante la RMN Metabolómica.

IV.1. Avances de la RMN en el análisis de matrices alimentarias.

La mayoría de los estudios metabolómicos aplicados a alimentos, realizados hasta ahora, se han centrado en el análisis de muestras líquidas o de extractos.^{176,177} Este hecho se debe principalmente a que la mayoría de los nutrientes pueden ser fácilmente extraídos mediante los procedimientos adecuados y que la mayoría de las tecnologías de detección de compuestos

¹⁷⁶ Halabalaki, M.; Vougianniopoulou, K.; Mikros, E.; Skaltsounis, A. L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, 25, 1-7.

¹⁷⁷ Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **2012**, 66, 1-39.

químicos están optimizadas para trabajar con líquidos. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se recurrió al empleo de una sonda de HRMAS que, como se ha mencionado (véase en el punto I.2.3.1.4. de la introducción y los trabajos de la parte experimental 4, 5, 6 y 7), permite el análisis directo de matrices semisólidas íntegras, con el único requisito de adicionar una pequeña cantidad de disolvente deuterado. Este procedimiento constituye un considerable avance en el análisis de matrices alimentarias, tanto por el ahorro de tiempo, como por la fiabilidad de los resultados dado que no se requiere la manipulación o el procesado de la muestra. En este contexto, el estudio metabolómico en muestras de salmón ahumado (**Trabajo 4**), fue uno de los primeros trabajos publicados en el que se describe el uso de la técnica de HRMAS en el análisis de matrices alimentarias.¹⁷⁸ Este mismo procedimiento se utilizó para estudiar el efecto de los tratamientos de irradiación (con electrones acelerados) en el salmón ahumado (**Trabajo 5**) y salmón fresco (**Trabajo 6**), así como en el estudio del envejecimiento en muestras cárnicas procedentes de solomillos de ternera (**Trabajo 7**). En conjunto, los resultados obtenidos en los cuatro trabajos realizados en músculos de distinto origen animal (ternera y salmón) han demostrado que el análisis espectroscópico, mediante la combinación de la espectroscopía de RMN y la sonda de radiofrecuencia de HRMAS, es una herramienta que permite el análisis rápido (pocos minutos) y no destructivo de la matriz íntegra. Cabe añadir que la sonda de HRMAS requiere cantidades muy pequeñas de muestra, pues el rotor generalmente utilizado tiene un volumen de 50 μL , por lo que la toma de muestra podría realizarse con una aguja de biopsia, sin deterioro de las piezas anatómicas estudiadas. El empleo de la sonda de HRMAS también permite el análisis directo de muestras líquidas (o sólidos resuspendidos) con una mínima dilución de la muestra (12-50 μL). Así, en los análisis previos de las muestras liofilizadas procedentes del exudado liberado por la carne (**Trabajo 7**), se evaluó la realización del estudio global mediante HRMAS. Para ello se compararon los espectros de exudado realizados con esta metodología y los obtenidos mediante una sonda convencional de líquidos. Los resultados fueron idénticos en cuanto a resolución espectral y relación señal a ruido, por lo que dadas las características de ambas posibilidades, se optó por la más sencilla consistente en el empleo de la sonda

¹⁷⁸ Valentini, M.; Ritota, M.; Cafiero, C.; Cozzolino, S.; Leita, L.; Sequi, P. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 121-125.

de líquidos y tubos de RMN de 5 mm. Sin embargo, el empleo de la sonda de HRMAS en muestras líquidas es una seria opción a tener en cuenta cuando se trabaja con escasa cantidad de muestra o se pretende detectar metabolitos presentes en muy baja concentración. El empleo de sondas de rf para muestras líquidas requiere el empleo de un mayor volumen de disolvente deuterado, que variará en función del diámetro de los tubos utilizados; así, si se emplean tubos de 5 mm, se necesitan alrededor de 500 - 600 μL y si se utilizan tubos capilares, entre 250 y 100 μL . En el resto de los estudios realizados en aceites (**Trabajos 1, 2 y 3**) y en las muestras de exudado de pescado y cárnico (**Trabajos 6 y 7**) se utilizaron sondas de líquidos y tubos de resonancia de 5 mm.

IV.1.1. Optimización y estandarización de la adquisición. (Trabajo 1)

La aplicación de la RMN al estudio de muestras alimentarias requiere de un proceso de estandarización y normalización de los métodos desarrollados por los diferentes grupos de investigación para poder ser comparados y evaluados.¹⁷⁹ En muchas ocasiones, la notación aplicada a las señales de los espectros de resonancia y por tanto a las ecuaciones o aproximaciones derivadas de su análisis, es muy diferente lo que dificulta la comparación de los métodos; por ello es importante un trabajo de estandarización. En ese sentido, durante el desarrollo de la Tesis se realizó un trabajo de optimización del análisis de ^1H -RMN en muestras de aceites vegetales mediante el estudio de los principales parámetros que afectan a la adquisición (el número de *scans*, NS; la anchura espectral, SW; el número de puntos de la FID, TD; los tiempos de espera y el ángulo del pulso de radiofrecuencia, α), tomando para ello unos criterios de aceptación del análisis (la relación entre la señal y el ruido mínima y la resolución espectral)¹⁸⁰ y correlacionando en todo momento el resultado obtenido a través de la RMN con el derivado del análisis de los mismos aceites mediante el método de referencia (*GC-FID*). Este tipo de optimización de los parámetros de adquisición, tan común en otras técnicas de análisis, no es frecuente en los estudios de RMN y por tanto puede servir como referente o ejemplo de cómo llevar a cabo la optimización de un método de RMN. Gracias a este trabajo se consiguió reducir el tiempo del análisis a menos de un minuto,

¹⁷⁹ Emwas, A.; Luchinat, C.; Turano, P.; Tenori, L.; Roy, R.; Salek, R. M.; Ryan, D.; Merzaban, J. S.; Kaddurah-Daouk, R.; Zeri, A. C. *Metabolomics* **2014**, 1-23.

¹⁸⁰ Holzgrabe, U. *Quantitative Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, 57, 229-240.

muy por debajo del presentado en trabajos anteriores, y sin perder robustez en el resultado frente al obtenido a través del método de referencia.

La adquisición de los espectros utilizados en este estudio (**Trabajo 1**) se realizó en un espectrómetro de RMN que opera a una frecuencia para el protón de 500 MHz (11,7 T), que es considerado un equipo de alto campo. Este ha sido el campo magnético utilizado en la mayoría de los trabajos incluidos en la Tesis (**Trabajos 1, 3, 4, 5, 6 y 7**), y es éste el campo generalmente utilizado en los estudios metabolómicos.¹⁸¹ Sin embargo, también se han empleado equipos con diferentes campos magnéticos en función de las necesidades de cada uno de los estudios realizados. Así, en estudios específicos que requerían más resolución espectral y/o más sensibilidad se llevaron a cabo experimentos en un equipo de 700 MHz previsto de una sonda criogénica, como se detalla, por ejemplo, en los estudios llevados a cabo para confirmar la señal de la metilamina (**Trabajo 6**). También se ha trabajado en la presente Tesis Doctoral con un equipo de campo bajo (300 MHz). Para ello se utilizó un espectrómetro de RMN de rutina utilizado habitualmente en la elucidación estructural básica. Este tipo de equipos tienen importantes ventajas en cuanto a su coste, requerimientos necesarios para su instalación y mantenimiento si los comparamos con equipos con un campo magnético más intenso. El equipamiento mencionado, se empleó en el estudio de aceites vegetales para intentar reproducir los buenos resultados obtenidos en el **Trabajo 1** en el análisis de la composición de ácidos grasos, realizados mediante RMN a campo alto. Además, se desarrolló un método de análisis automático que, a bajo campo, permitiera obtener la composición de ácidos grasos sin la intervención de un operador cualificado. Para el desarrollo de este aspecto, fue necesaria la optimización de los parámetros de adquisición y de las condiciones del análisis de ¹H-RMN (**Trabajo 2**).

En el **Trabajo 1** se propuso una nomenclatura cuyo principal objetivo es intentar estandarizar la notación utilizada en la literatura científica en la identificación de las 10 señales características del espectro de ¹H-RMN de los aceites vegetales. Aunque modesto, este trabajo de normalización simplifica la comparación de los diferentes trabajos publicados que utilizan la espectroscopía de RMN en el estudio de aceites vegetales. Han sido diferentes los autores que

¹⁸¹ Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **2012**, 66, 1-39.

han aplicado la RMN para obtener la composición de los ácidos grasos presentes en distintos aceites vegetales.^{182,183,184,185} En cada uno de estos trabajos descritos, para realizar el cálculo de la composición de ácidos grasos se proponen una serie de expresiones matemáticas que emplean diferentes nomenclaturas y aproximaciones de cálculo.

Una vez definida la notación a utilizar para la asignación de cada una de las señales presentes en el espectro de ^1H -RMN, se tradujeron todas las ecuaciones propuestas en los trabajos anteriores y se incorporaron en el trabajo de evaluación de las nuevas opciones propuestas. Así, se definieron seis sistemas de ecuaciones diferentes. Éstos se evaluaron frente a tres aceites de composición muy distinta: aceite de oliva, compuesto mayoritariamente de ácido oleico; aceite de girasol, de ácido linoleico y aceite de lino que mayoritariamente contiene ácido linolénico. A través de este modelo se consideró que los resultados obtenidos podrían ser extrapolables a cualquier aceite vegetal. Finalmente, se propusieron las ecuaciones y aproximaciones que proporcionaron un mejor resultado a la hora de obtener la composición de ácidos grasos a través del espectro de ^1H -RMN. Tanto las ecuaciones seleccionadas como la notación propuesta en el **Trabajo 1** fueron posteriormente empleadas en los **Trabajos 2 y 3**.

IV.1.2. Elucidación estructural de mezclas alimentarias. (Trabajos 3, 4, 6 y 7)

Uno de los principales problemas que se encuentra el investigador en Ciencia y Tecnología de los Alimentos cuando aborda un estudio mediante RMN, es poder interpretar los datos espectroscópicos. La asignación de los metabolitos presentes es una ardua labor que en muchos casos supone un freno a la aplicación de la técnica, especialmente si se analizan alimentos o matrices que no han sido descritos previamente.¹⁸⁶ La publicación de trabajos de asignación, así como el desarrollo de las bases de datos metabolómicas aplicadas a alimentos permite que esta barrera sea cada vez más franqueable.

¹⁸² Barison, A.; da Silva, C. W.; Campos, F. R.; Simonelli, F.; Lenz, C. A.; Ferreira, A. G. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 642-650.

¹⁸³ Vigli, G.; Philippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5715-5722.

¹⁸⁴ Guillen, M. D.; Uriarte, P. S. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7790-7799.

¹⁸⁵ Sedman, J.; Gao, L.; García-González, D.; Ehsan, S.; van de Voort, F. R. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **2010**, *112*, 439-451.

¹⁸⁶ García-Cañas, V.; Simó, C.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10150-10159.

Durante el desarrollo de la presente Tesis, se han llevado a cabo laboriosos trabajos de elucidación estructural de diferentes matrices alimentarias mediante el empleo de la espectroscopía de RMN 1D y 2D. Este avance en la identificación de las señales presentes en los espectros de RMN en matrices cárnicas (**Trabajo 7**), de pescado (**Trabajos 4 y 6**) y en aceites vegetales (**Trabajos 1 y 3**), supone un adelanto significativo para futuras investigaciones. Prueba de ello es que el **Trabajo 4**, donde se realizó la elucidación estructural de muestras de músculo de salmón ahumado y se aportó una tabla detallada de la composición química de los principales metabolitos presentes en el espectro de ^1H -RMN, ya ha sido citado en una veintena de trabajos y empleado como referencia obligada en la elucidación estructural de diversas matrices, incluso en tumores de hígado en modelos de ratón.¹⁸⁷ Esto pone de manifiesto que el trabajo de asignación desarrollado en esta Tesis, no se circunscribe al campo de los alimentos, ya que el metaboloma de muchas de las muestras analizadas, posee elementos en su composición que son comunes a muchos biofluidos o tejidos utilizados en otros campos de investigación. En la tabla de asignación del **Trabajo 4** se aporta toda la información espectroscópica (obtenida a través de los espectros 1D y 2D) de 160 señales presentes en el espectro de ^1H -RMN. Así, se indica su desplazamiento químico, multiplicidad, constante de acoplamiento y las principales correlaciones bidimensionales tanto homo como heteronucleares. La resolución obtenida en el espectro de ^1H -RMN/HRMAS de salmón ahumado permitió la asignación de señales correspondientes a los ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos así como confirmar la presencia de hidratos de carbono, nucleótidos y derivados, osmolitos, aminoácidos, dipéptidos y ácidos orgánicos. De las 160 señales listadas en la tabla, 151 fueron correlacionadas con el metabolito del que forman parte y algunas de las señales no identificadas en el **Trabajo 4**, fueron identificadas posteriormente al realizar la elucidación estructural de otras matrices. Así, por ejemplo, las señales 47 y 61 del **Trabajo 4**, que no se habían asignado a compuesto alguno (aunque se sabía que pertenecían al mismo analito, pues tenían entre ellas una correlación homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY), fueron posteriormente identificadas en la tabla de asignación del **Trabajo 7** (señales 65 y 83) como pertenecientes a la beta alanina. Además, la buena resolución espectral permitió, por primera vez, la

¹⁸⁷ Unterberger, E. B.; Eichner, J.; Wrzodek, C.; Lempiäinen, H.; Luisier, R.; Terranova, R.; Metzger, U.; Plummer, S.; Knorpp, T.; Braeuning, A. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 1574-1585.

determinación semicuantitativa del ácido docosahexaenoico (*DHA*; 22:6 ω 3) en músculo de salmón intacto y, por sustracción del total de ácidos omega 3 presentes, la determinación del ácido eicosapentaenoico (*EPA*; 22:5 ω 3). La monitorización de estos ácidos grasos es importante pues se cree que poseen un significativo efecto cardioprotector, produciendo una disminución de la morbilidad y de la mortalidad causadas por enfermedades cardiovasculares.¹⁸⁸

La forma de mostrar la información espectroscópica en las tablas de asignación publicadas en los diferentes trabajos de la presente Tesis Doctoral ha mantenido la misma pauta. Las señales de resonancia se clasificaron acorde a su desplazamiento químico creciente y no en función de familias de compuestos o simplemente por compuestos, práctica habitual en buena parte de la literatura.¹⁸⁹ Se tomó este criterio a la hora de ordenar la información espectroscópica, ya que facilita la interpretación de los datos obtenidos durante el trabajo de elucidación y por tanto simplifica su uso.

Como se mencionó anteriormente, un avance importante en la identificación de compuestos mediante RMN en muestras cárnicas se ha descrito en el **Trabajo 7**, donde se proporciona la elucidación estructural del exudado cárnico. Este trabajo describe por primera vez, hasta donde los autores conocen, la composición metabólica del exudado. Este trabajo de identificación ha permitido asignar 60 metabolitos, 23 de los cuales no habían sido descritos en trabajos previos de RMN en el estudio de diferentes muestras cárnicas. La tabla de asignación muestra 226 señales presentes en el espectro de ^1H -RMN del exudado. Como en el caso del salmón, la tabla incluye una completa descripción de los datos espectroscópicos. Además, el trabajo incluye una extensa información suplementaria donde se muestran las ampliaciones de las regiones alifática, olefínica y aromática de los experimentos 2D (^1H , ^1H -TOCSY y ^1H , ^{13}C -HSQC) utilizados en la elucidación estructural.

A modo de ejemplo se muestran en la **Figura IV.1** los espectros de ^1H -RMN/HRMAS de una muestra representativa de salmón fresco y de solomillo de ternera.

¹⁸⁸ Aursand, M.; Gribbestad, I. S.; Martínez, I. in *Application in Chemistry, Biological and Marine Science*, vol. 1 (Ed.: G. A. Webb), Springer: New York, 2006, 931.

¹⁸⁹ Shumilina, E.; Ciampa, A.; Capozzi, F.; Rustad, T.; Dikiy, A. *Food Chem.* **2015**, *184*, 12-22.

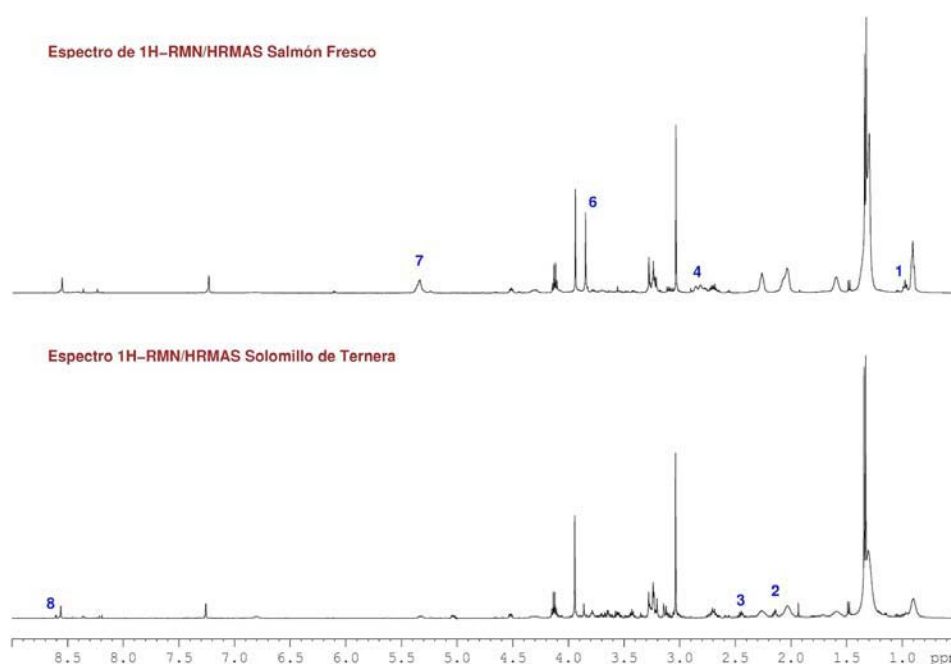


Figura IV.1. Espectros de ¹H-RMN/HRMAS de salmón fresco (arriba) y de solomillo de ternera (abajo), adquiridos a 500 MHz.

Las principales diferencias en el espectro de ¹H-RMN entre la matriz cárnica y las muestras de salmón, como era de esperar, se encuentran en la composición de ácidos grasos. El salmón presenta un espectro ¹H donde las señales de los ácidos grasos son sensiblemente más intensas. Además, el espectro de salmón muestra las señales características de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (1 y 4) que están ausentes en el espectro del músculo de ternera, o la señal correspondiente a los protones de los dobles enlaces (señal 7), que es mucho más intensa en el salmón que en muestras de ternera. Como hemos visto en algunos estudios realizados durante el desarrollo de la presente Tesis (**Trabajos 2 y 3**), a partir de la integración de esta mencionada señal 7, se puede obtener el valor del índice de yodo,¹⁹⁰ utilizado habitualmente para definir el grado de instauración en aceites vegetales. En el espectro del salmón también se ha destacado la señal 6, correspondiente a la anserina, dipéptido presente también en la carne pero en una concentración sensiblemente inferior. Por el contrario, la carne presenta la señal de otro dipéptido (señal 8) no identificado en las muestras de salmón, la carnosina. Los espectros de músculo de ternera también mostraron señales características de

¹⁹⁰ Guillén, M. D.; Uriarte, P. S. J. *Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 7790-7799.

la carne como la carnitina o la acetilcarnitina así como una mayor concentración de aminoácidos sápidos como la glutamina y el glutamato.

La utilización del exudado no se ha centrado exclusivamente en muestras cárnicas sino que también se ha empleado en muestras de salmón (**Trabajo 6**), asignando metabolitos derivados de metilamina. El estudio de elucidación llevado a cabo en este trabajo, ha servido para identificar la monometilamina, metabolito no asignado en ninguno de los trabajos previos que abordan el estudio de muestras de pescado mediante RMN.^{191,192} Además, el estudio de identificación de los metabolitos presentes realizado en los **Trabajos 6 y 7** en muestras de salmón y ternera sobre matrices de músculo y exudado, permitió demostrar que el exudado es un fiel reflejo de la muestra de músculo de la que procede, tanto en muestras cárnicas (**trabajo 7**) como en muestras de pescado (**trabajo 6**). En el trabajo 7 se describe con detalle la metodología en la que se fundamenta tal afirmación. De acuerdo con los resultados de este estudio, el exudado constituye una muestra adecuada para el análisis rutinario en el control de calidad y seguridad alimentaria.

En la presente Tesis, también se ha trabajado en la identificación de los metabolitos presentes en muestras de origen vegetal. Así, se han identificado los compuestos presentes en muestras de aceites intactos y en aceites que se han sido sometidos a un proceso de oxidación térmica. En este sentido se ha descrito la composición y la identificación de las señales de RMN de un nuevo aceite vegetal no estudiado hasta ahora por RMN, obtenido como subproducto en la industria, que es el aceite de cardo. Dicho aceite se incluyó en el estudio realizado mediante RMN y REE, para valorar su comportamiento frente al de otros aceites culinarios (aceite de oliva y girasol). Gracias a la completa asignación de los subproductos de la oxidación térmica, se pudo evaluar satisfactoriamente el diferente comportamiento de los tres aceites.

¹⁹¹ Martínez, I.; Bathen, T.; Standal, I. B.; Halvorsen, J.; Aursand, M.; Gribbestad, I. S.; Axelsson, D. E. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6889-6895.

¹⁹² Shumilina, E.; Ciampa, A.; Capozzi, F.; Rustad, T.; Dikiy, A. *Food Chem.* **2015**, *184*, 12-22.

IV.2. Avances en el análisis metabolómico y la monitorización de diferentes procesos sobre matrices alimentarias mediante RMN.

La RMN es una técnica espectroscópica no destructiva que permite el análisis de las matrices alimentarias sin necesidad de pasos previos de derivatización y/o separación. Este hecho unido a que la metabolómica, como técnica holística, trata de abordar el estudio de las muestras en su conjunto, ha conducido a que durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se hiciera hincapié en el análisis de la matriz alimentaria integra, tratando de evitar, en la medida de lo posible, la alteración y/o manipulación de las muestras. Así, se han analizado muestras de aceites vegetales (**Trabajos 1, 2 y 3**), con un único paso de preparación de la muestra, que consiste en su dilución en un solvente deuterado. Se han analizado muestras íntegras de músculo tanto de ternera (**Trabajo 7**) como de salmón (**Trabajos 3, 4 y 5**) mediante el empleo de la sonda de HRMAS y también se han estudiado exudados cárnicos (**Trabajo 7**) y de pescado (**Trabajo 6**). Previamente al análisis, los exudados fueron liofilizados y resuspendidos en agua deuterada (D₂O).

En el estudio de los miosistemas íntegros, la sonda de HRMAS permite el análisis de una porción semisólida con la única adición, por cuestiones propias de la técnica, de una pequeña cantidad de disolvente deuterado. Además, teniendo en cuenta el volumen de los rotores utilizados en la adquisición (12 o 50 μ L) y por tanto, la pequeña cantidad de muestra requerida (unos pocos miligramos), esta metodología permite el análisis de matrices heterogéneas, adquiriendo los espectros de RMN (por ende la información metabólica) de todos y cada uno de los diferentes tejidos que componen el alimento.¹⁹³ Sin embargo, esta ventaja puede convertirse en una desventaja en las muestras de salmón, donde el tejido conectivo graso (miosepto) envuelve los segmentos musculares (miotomo) y las vetas de grasa se encuentran intercaladas entre el músculo. La concentración de ácidos grasos es muy alta y por tanto la selección de la muestra no es sencilla (incluso recurriendo a procesos de homogeneización del músculo). La toma de muestra de una porción de miotomo lleva asociada una variabilidad en la cantidad de ácidos grasos presentes. Como ya se mencionó durante la parte experimental, las señales de

¹⁹³ Rigbi, V.; Mucci, A.; Schenetti, L.; Tosi, M. R.; Grigioni, W. F.; Corti, B.; Bertaccini, A.; Franceschelli, A.; Sanguedolce, F.; Schiavina, R.; Martorana, G.; Tugnoli, V. *Anticancer Res.* **2007**, 27, 3195-3204.

los ácidos grasos aparecen, como señales muy intensas y anchas en una amplia región espectral (entre 0.85 y 5.5 ppm). Por todo ello, el análisis de la muestra de músculo de salmón mediante HRMAS presentó una variabilidad entre los espectros de ^1H -RMN asociada a la toma de muestra. Este hecho dificultó en gran medida la utilización completa del espectro al aplicar las herramientas quimiométricas, “enmascarando” los posibles cambios producidos entre las muestras como consecuencia de las diferentes variables/procesos estudiados. Este problema se puso de manifiesto en el **Trabajo 5**, donde se aplicó el análisis de componentes principales a diferentes regiones espectrales: de 0,10 a 8,80 ppm (espectro completo); de 5,90 a 8,80 ppm (señales olefínicas y aromáticas) y de 2,97 a 4,90 ppm (región que excluye las señales correspondientes a los ácidos grasos), para analizar las posibles diferencias entre muestras de salmón ahumado irradiado y no irradiado. Los mejores resultados se obtuvieron analizando las regiones que excluyen las señales de los ácidos grasos y por tanto buena parte del espectro de ^1H -RMN. Durante el desarrollo de la presente Tesis se llegó a la conclusión de que este problema se podría solventar mediante el empleo de una matriz que no ha sido prácticamente estudiada,¹⁹⁴ el **exudado** y que, como ya se ha mencionado, se ha analizado por primera vez tanto en muestras de pescado (**Trabajo 6**) como en muestras de carne (**Trabajo 7**). El exudado se trata de una solución acuosa que se libera del miosistema durante su almacenamiento y por tanto, su contenido en ácidos grasos es al mismo tiempo bajo y homogéneo. Uno de los primeros retos, como se mencionó en el apartado anterior, fue evaluar su composición y estudiar si el exudado recogido representaba fielmente la composición de la matriz cárnica o de pescado de la que procedía. El estudio realizado demostró que el exudado es un fiel reflejo del miosistema del que procede (**Trabajos 6 y 7**). Así, como se muestra en el **Trabajo 7**, los espectros del exudado y de la carne presentan grandes similitudes. Un análisis más exhaustivo reveló que, salvo alguna excepción en las señales de los ácidos grasos, prácticamente todas las señales presentes en los espectros de la carne ($98.0 \pm 0.3\%$; $n = 6$) también aparecen en los espectros de exudado. Así, las señales de aminoácidos, dipéptidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos y nucleótidos, también se observan en el espectro de ^1H -RMN de las muestras de exudados. Además, las similitudes encontradas entre los

¹⁹⁴ Otto, G.; Roehe, R.; Looft, H.; Thoelking, L.; Knap, P. W.; Rothschild, M. F.; Plastow, G. S.; Kalm, E. *Meat Sci.* **2007**, 75, 185-195.

espectros de exudado y los de la carne, no sólo se observan en las diferentes señales de RMN presentes en cada uno de ellos, sino también en la relación de sus intensidades. Tomando como referencia la señal de la anserina,^{195,196} se ha encontrado una buena correlación ($p = 0.01$) entre los espectros de HRMAS de la carne y los exudado. Estos resultados permiten afirmar que los problemas de variabilidad de señal encontrados al analizar muestras muy grasas, como el salmón, mediante HRMAS, podrían solventarse analizando muestras de exudado, ya sea por HRMAS o simplemente a través de RMN para muestras líquidas.

En cuanto a la recolección de las muestras de exudado, uno de los problemas encontrados cuando empezamos a trabajar con ellas fue precisamente la toma de muestra. Se requería un método de recogida que permitiera recoger las muestras de exudado de forma homogénea y aplicar un procedimiento estandarizado. Así, los miosistemas se envasaron a vacío y se almacenaron a 4 °C durante 24 horas; transcurrido ese tiempo se recogieron los exudados y se almacenaron a -80 °C. Esta forma de obtener el exudado es similar a la que se puede encontrar en muchos envasados comerciales. Una vez obtenidos los exudados totales de cada estudio, las muestras fueron liofilizadas con un doble objetivo: eliminar la señal del agua, que supone una seria interferencia en los estudios mediante ¹H-RMN y, a su vez, conseguir un efecto concentrador para compensar la menor sensibilidad de la espectroscopía de RMN. Los resultados, como se muestra en el **Trabajo 6**, fueron muy positivos, ya que permitieron realizar el análisis del espectro completo en el caso del salmón, evitando los problemas descritos previamente asociados a la señal de los ácidos grasos (**Trabajos 4 y 5**). Los resultados revelaron que las muestras de exudado presentaban una elevada homogeneidad (como era de esperar al tratarse de un extracto natural) y, además, la toma de muestra a través del método estandarizado fue muy reproducible. En base a lo anterior y teniendo en cuenta que el exudado es una muestra de desecho que no implica una manipulación de la muestra de músculo de la que proviene, se trata de una matriz con un gran potencial para afrontar los análisis de rutina que habitualmente se llevan a cabo en el control de calidad y seguridad alimentaria.

¹⁹⁵ Toldrá, F.; Aristoy, M.; Flores, M. *Food Res. Int.* **2000**, 33, 181-185.

¹⁹⁶ Peiretti, P. G.; Medana, C.; Visentin, S.; Giancotti, V.; Zunino, V.; Meineri, G. *Food Chem.* **2011**, 126, 1939-1947.

IV.2.1. Diferentes aproximaciones en el abordaje de un análisis metabolómico.

Antes de empezar un estudio metabólico, en función del conocimiento previo disponible acerca del problema biológico/bioquímico y de la información que se quiera obtener del estudio, se habrá de seleccionar el tipo de análisis metabolómico más apropiado (*ver introducción, apartado 1.3.1*). En aquellos casos en los que se conozca el número y el tipo de metabolitos de interés, se puede realizar una *aproximación dirigida*. Un análisis dirigido o *Targeted analysis* persigue la determinación cuantitativa de unos pocos analitos, pertenecientes a una misma clase de compuestos, que posean un especial interés en el sistema alimentario bajo estudio en base a estudios realizados con anterioridad.¹⁹⁷ Un ejemplo de este tipo de análisis es el desarrollado en la presente Tesis en el **Trabajo 6**, donde unos pocos metabolitos derivados de metilamina (óxido de metilamina, OTMA, trimetilamina, TMA, dimetilamina, DMA y monometilamina MMA) son analizados como compuestos diana. Ello fue posible gracias al conocimiento previo obtenido en los **Trabajos 4 y 5**. En el **Trabajo 4** se realizó la asignación de la mayoría de los metabolitos presentes en el espectro de ¹H-RMN/HRMAS de muestras de salmón ahumado, buscando el análisis imparcial de todos los intermedios presentes en la muestra. Este tipo de estudio constituye un ejemplo de un *análisis metabolómico*. Otro ejemplo fue el desarrollado en el **Trabajo 7**, para afrontar el estudio del exudado cárnico y la posible información metabólica derivada del periodo de almacenamiento/envejecimiento. Se eligió aquí llevar a cabo un análisis previo que incluyera un trabajo exhaustivo de identificación y cuantificación de todos los metabolitos de la muestra (especialmente como consecuencia de la prácticamente inexistente información acerca del exudado). Por ello se optó por realizar una aproximación no-dirigida (*untargeted analysis*). Teniendo en cuenta que este enfoque revela el metaboloma del sistema biológico en estudio, el enfoque analítico empleado para dar respuesta a las preguntas específicas de nuestros análisis fue el *metabolómico*. Pero a veces no es necesario realizar estudios que se centren en analizar los diferentes metabolitos presentes, sino que se utilizan los espectros completos para discriminar entre dos tipos distintos de muestras. Este tipo de estudio se conoce como *análisis de huella dactilar* y fue el realizado con las muestras de salmón ahumados irradiadas y no

¹⁹⁷ Laghi, L.; Picone, G.; Capozzi, F. *Trends Anal. Chem.* **2014**, 59, 93-102.

irradiadas, en las que se estudió si el espectro de ^1H -RMN servía para clasificar las muestras de salmón ahumado no irradiadas e irradiadas a 1 y 4 KGy (**Trabajo 5**).

La aplicación de las técnicas quimiométricas a los datos espectroscópicos obtenidos con los equipos de RMN, permite el análisis de forma global de grandes cantidades de datos derivados de los espectros de muestras complejas. Este tipo de estudios eran difíciles de plantear antes del desarrollo de la metabolómica y por tanto, de las herramientas informáticas necesarias para poder llevar a cabo dicho abordaje. Dentro de las técnicas quimiométricas de análisis (ver Introducción, punto I.3.4), existen métodos *no supervisados* que no requieren conocimiento previo de las muestras, resultando de gran utilidad para la identificación de patrones y/o tendencias dentro de los grupos estudiados.¹⁹⁸ Dentro de los métodos no supervisados uno de los más utilizados es el análisis por componentes principales (PCA), que permite representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad, de manera que las múltiples variaciones quedan agrupadas en distintos componentes principales, de acuerdo a su importancia en la interpretación de la variable observada. Durante el desarrollo de la presente Tesis, la aplicación del análisis multivariante no supervisado (PCA) se utilizó en los **trabajos 3, 5 y 7**. Así, en el **trabajo 5** el espectro de resonancia fue segmentado en regiones rectangulares de 0.04 ppm y sobre la matriz de datos obtenida se aplicó un análisis por componentes principales para intentar clasificar las muestras en función del grado de irradiación. Este método no supervisado de clasificación permitió clasificar las muestras e identificar aquellas regiones que más contribuyen a la discriminación entre muestras irradiadas y no irradiadas. La representación del componente principal 1 (PC1) frente a PC2 fue la que proporcionó la mejor clasificación entre ambos tipos de muestras. Otro ejemplo de este tipo de análisis fue el desarrollado en el **trabajo 7**, donde a diferencia del caso anterior, cada espectro (9.05 a 0.93 ppm) fue segmentado en regiones espectrales de anchura variable. Estas regiones (54), de ancho variable, fueron seleccionadas para evitar las variaciones de desplazamiento químico como consecuencia de trabajar con muestras de exudado no tamponadas. El análisis de componentes principales fue aplicado a la matriz total de datos compuesta por 54 regiones espectrales de

¹⁹⁸ Monakhova, Y. B.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W. *J. Anal. Chem.* **2013**, 68, 755-766.

un total de 48 muestras cárnicas, comprendidas en un rango de 3 a 24 días *postmortem*. La proyección de PC1 vs PC2 mostró un buen agrupamiento de las muestras, especialmente a lo largo del componente principal 1, que permitió la clasificación de las muestras en función de su día *postmortem*. El análisis de los principales buckets (segmentos) que presentaban cambios, se asociaron prácticamente a los mismos grupos de compuestos/procesos descritos con detalle en el estudio metabólico del salmón ahumado almacenado entre 0 y 45 días (**trabajo 4**).

En el caso de estudios que requieran solventar problemas de clasificación y/o de predicción, será necesaria la aplicación de técnicas multivariantes supervisadas. El objetivo fundamental de estas técnicas es obtener funciones de clasificación a partir de la información proporcionada por las variables analizadas en las muestras pertenecientes a los diferentes grupos que constituyen el denominado “conjunto de entrenamiento” (“*training data set*”). Este conjunto de muestras se puede utilizar para confirmar que existen diferencias entre los grupos de clasificación y también para predecir la clasificación de muestras ciegas (“*test data set*”). Este tipo de análisis supervisado se utilizó en el análisis de las muestras de exudado cárnico (**Trabajo 7**). A partir de la clasificación de las muestras en la dirección de PC1 en función de su día *postmortem*, se planteó la posibilidad de predecir la edad de la muestra de exudado. Para ello se desarrolló un modelo supervisado de análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). Mediante este análisis se construyó un modelo con 39 de las muestras de exudado cárnico en las que se incluía una tabla donde se introducía el valor del día *postmortem* que le correspondía a cada una de ellas. Una vez generado el modelo, se utilizaron las 9 muestras restantes para evaluar su capacidad de predicción. A pesar de la gran variabilidad de las muestras (diferente género, origen y/o raza) se obtuvo un error de predicción de ± 1.6 días, que pone de manifiesto el potencial del análisis del exudado por RMN ya que, mediante el análisis de RMN Metabolómico de una muestra desconocida, se puede predecir el tiempo que ha transcurrido desde que el animal del que proviene la carne, en este caso ternera, ha sido sacrificado, con un error de ± 1.6 días.

La RMN ha demostrado ser una técnica capaz de monitorizar diferentes procesos que se producen durante el almacenamiento, procesado y/o

alteración de los alimentos.¹⁹⁹ En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado cómo las muestras de salmón y ternera evolucionan durante el periodo de almacenamiento/envejecimiento. En muestras de salmón se ha ido más allá y se ha analizado la influencia de la radiación beta y su efecto conservador tanto sobre el músculo de salmón ahumado en frío (**Trabajo 5**), como sobre el músculo y el exudado de salmón fresco (**Trabajo 6**). Por otro lado, se ha estudiado el proceso de oxidación con muestras de aceites vegetales (oliva, girasol y cardo) (**Trabajo 3**), analizando cómo varía la composición de ácidos grasos, identificando los subproductos formados como consecuencia de la termooxidación y evaluando el grado de estabilidad oxidativa a través de la espectroscopía de REE.

IV.2.2. Aplicación al estudio del almacenamiento de matrices alimentarias. (Trabajos 1, 4, 6 y 7)

En la presente Tesis se ha planteado el estudio del proceso de envejecimiento y/o almacenamiento en diferentes matrices con el objetivo de profundizar en la información que es posible obtener a través de la espectroscopía de RMN. Con este fin se estudiaron:

- Muestras de músculo de salmón ahumado. En el **Trabajo 4** se comprobó el efecto del almacenamiento en el perfil metabólico analizando muestras almacenadas a 4 °C entre 0 y 45 días.
- Muestras de exudado de salmón fresco. En el **Trabajo 6** se analizaron muestras de exudado de salmón fresco almacenadas a 4 °C entre 1 y 12 días.
- Muestras de exudado de solomillo de ternera. En el **Trabajo 7** se analizaron los exudados de ternera de muestras almacenadas a 4 °C entre 3 y 24 días después del sacrificio.

Se sabe que los cambios *postmortem* que se producen en los alimentos de origen animal durante el almacenamiento, están asociados a procesos enzimáticos y bacterianos. Así, en muestras de pescado, los cambios enzimáticos relativos a su frescura preceden y no guardan relación con los

¹⁹⁹ Marcone, M. F.; Wang, S.; Albabish, W.; Nie, S.; Somnarain, D.; Hill, A. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 729-747.

cambios de la calidad microbiológica.²⁰⁰ La frescura es uno de los atributos más importantes cuando se trata de la calidad del pescado. El pescado es un sustrato frágil, muy proclive a las alteraciones, y generalmente se asume que se deteriora con el almacenamiento, que tiene por tanto una connotación negativa. Durante el almacenamiento se producen una gran variedad de procesos químicos que poseen una importancia crucial en la evaluación de la calidad del pescado. Por ello son necesarias técnicas que permitan la caracterización simultánea de un amplio número de compuestos y es aquí donde la espectroscopía de RMN juega un papel privilegiado.²⁰¹ Por el contrario, la carne posee una estructura mucho más organizada, que necesita tiempos de almacenamiento más largos para el desarrollo del sabor y así, poder alcanzar las características sensoriales óptimas. Por ello, se utiliza el término envejecimiento-maduración en los procesos de almacenamiento de la carne, ya que se trata de una práctica normal utilizada para conferir mayor valor al producto final como consecuencia del desarrollo de los aromas. Poco se ha estudiado en relación a los metabolitos presentes y su correlación con la calidad de la carne, por lo que es muy importante el desarrollo de métodos de análisis que permitan obtener el perfil metabolómico de la carne de forma comprensible, indicando qué metabolitos varían durante la maduración y cómo se asocian esos cambios con el sabor y el flavour.

Como se mencionó anteriormente (Ver capítulo I.3 de la Introducción), a través del espectro de ^1H -RMN se obtiene información metabolómica de la muestra mediante la monitorización de las señales de resonancia de los metabolitos de bajo peso molecular. Es así posible identificar ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos, hidratos de carbono, nucleótidos y derivados, osmolitos, aminoácidos, dipéptidos y ácidos orgánicos entre otros. A continuación se detalla la evolución de los diferentes metabolitos agrupados por tipos de compuestos en las matrices analizadas.

Comenzando con la posibilidad de seguir el proceso de degradación de los **carbohidratos**, para monitorizar su evolución, se estudiaron primordialmente las señales correspondientes a los protones anoméricos que

²⁰⁰ Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. In H. H. Huss (Ed.). FAO fisheries technical paper No.338. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.

²⁰¹ Minoja, A. P.; Napoli, C. *Food Res. Int.* **2014**, 63, 126-131.

aparecen en la región alifática superior-olefínica del espectro, por lo que no presentan problemas de solapamiento con otros metabolitos de la muestra (salvo con la señal residual del agua). El resto de señales de los azúcares aparecen en el rango espectral entre 3.4 y 3.9 ppm, completamente solapadas con otras señales asociadas a otros metabolitos. Así, aparecen los dobletes característicos a 4.66 ppm (β -Glucosa), 5.18 ppm (α -Manosa) o 5.24 ppm (α -Glucosa), que fueron asignados en el exudado de ternera y a 4.66 ppm (β -Glucosa), 5.24 ppm (α -Glucosa) o 5.42 ppm (Sacarosa), asignados en muestras de músculo de salmón ahumado. El estudio permitió observar cómo las señales de los azúcares evolucionan durante el tiempo de almacenamiento/envejecimiento. En el estudio realizado en muestras de salmón ahumado (**Trabajo 4**), la señal de los azúcares disminuyó progresivamente con el tiempo y pasados 30 días ya no fue observada. Como era de esperar, su degradación fue más rápida en muestras de salmón fresco (**Trabajo 6**). Así, el espectro de ^1H -RMN de las muestras de exudado almacenadas durante 6 días, ya no presentaba las señales características de los azúcares, mientras que en el caso de las muestras de exudado de ternera (**Trabajo 7**), las señales de los azúcares dejaron de aparecer en el espectro de ^1H -RMN pasados 18 días *postmortem*. Esta disminución de los azúcares se asoció en todos los trabajos a la carga bacteriana presente en las muestras; de esta forma, el análisis de la evolución de los azúcares podría servir como un indicador de la carga microbiana presente y además, en función de los productos finales de la fermentación detectados en el espectro de ^1H -RMN, se podría obtener información acerca de los tipos de microorganismos presentes (ver **Figura IV.2**). La realización de estudios más específicos en los que se evaluaría la carga microbiana de las muestras en función de las señales del espectro de ^1H -RMN, podría conducir al establecimiento de modelos de correlación que servirían para evaluar los diferentes procesos de conservación aplicados (atmosferas modificadas, altas presiones, ahumado, etc.) y la optimización de los mismos.

A través del espectro de ^1H -RMN se pudieron monitorizar tanto en muestras de salmón (**Trabajo 4**), como de ternera (**Trabajo 7**), diferentes **ácidos orgánicos**. Así, se identificaron, entre otros, ácido succínico, acético, fumárico y fórmico. La mayoría de ellos aumentaron como consecuencia de los procesos de

degradación que sufrieron las muestras durante su almacenamiento. En el estudio de las muestras de exudado de ternera, por ejemplo, la contribución de estas señales fue muy importante a la hora de poder clasificar las muestras en función del tiempo *postmortem* (**Trabajo 7**). Como se observa en la **Figura IV.2**, la mayoría de estos compuestos son productos finales de la fermentación de los carbohidratos.

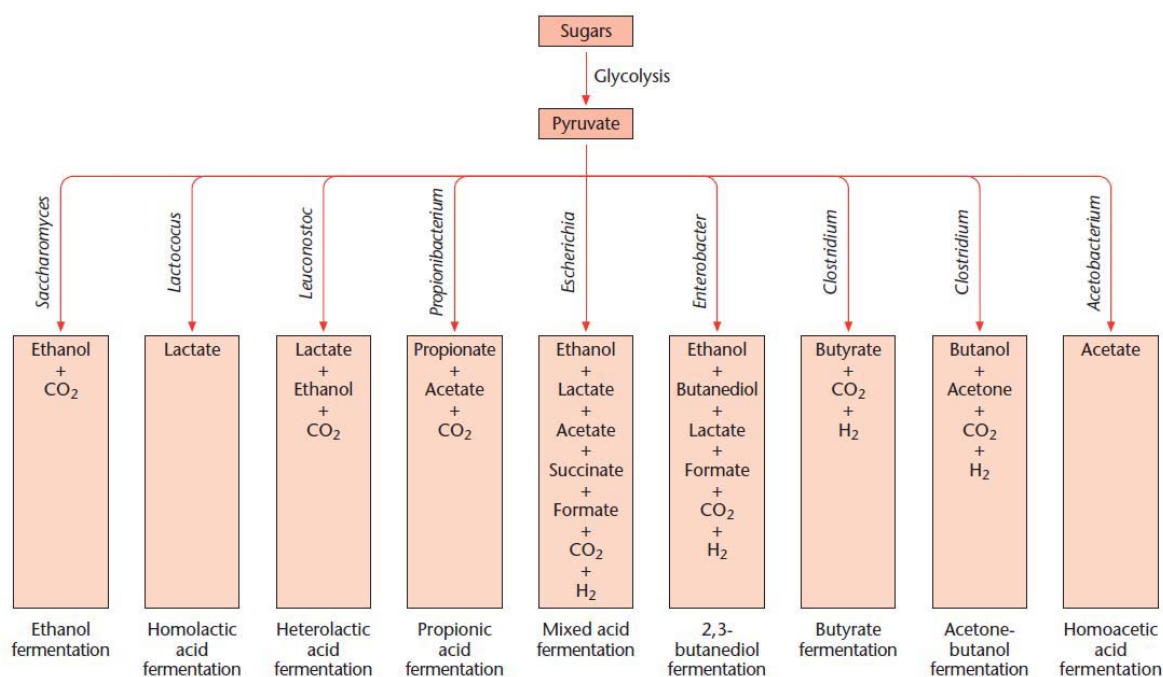


Figura IV.2. Principales vías de fermentación de los azúcares junto con los organismos involucrados y los productos finales de la fermentación.²⁰²

Se conoce que uno de los primeros cambios que se producen después de la muerte es la degradación de los compuestos relacionados con el ATP. Así, el ATP se degrada para formar adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx). Estos cambios pudieron ser monitorizados en las muestras de ternera y de salmón analizadas gracias a las señales aromáticas características de los nucleótidos en el espectro de ¹H-RMN. Se trata de singletes que aparecen generalmente en el rango espectral comprendido entre 8.27 y 8.15 ppm. Asimismo, pudo seguirse claramente la conversión de IMP a Ino y de Ino a Hx. Las señal de la IMP y de la Ino desaparecieron de forma progresiva a la vez que fueron aumentando las señales correspondientes a la Hx. Otras señales características de los

²⁰² Müller, V. In *Bacterial Fermentation*; John Wiley&Sons: Chichester. U.K., 2008. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001415.pub2.

nucleótidos fácilmente monitorizadas en el espectro de ^1H -RMN de nuestras muestras, fueron los dobletes asociados a los protones anoméricos de la ribosa, que aparecen en el rango espectral entre 6.20 y 6.05 ppm. Al igual que sucedía con los carbohidratos, los ritmos de degradación de estas señales de los nucleótidos fueron diferentes en función de la matriz estudiada. Así, en las muestras de salmón ahumado la desaparición prácticamente total de la señal de la Ino se produjo tras 30 días de almacenamiento, mientras que en salmón fresco, pasados 6 días, la Ino ya no pudo ser detectada. En el caso de las muestras de ternera el proceso de conversión total de la Ino en Hx no se produjo hasta alcanzar los 24 días desde el sacrificio.

Esta ruta de degradación del ATP fue descrita por primera vez por Saito et al.,²⁰³ quien a partir de los cambios observados desarrolló un Índice de frescura para muestras de pescado (*Índice K*):

$$K(\%) = \frac{[\text{Ino}] + [\text{Hx}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{Ino}] + [\text{Hx}]} \times 100$$

Donde [ATP], [ADP], [AMP], [IMP], [Ino] e [Hx], representan las concentraciones relativas de cada uno de estos compuestos en el músculo de pescado, medidas en diferentes períodos de tiempo durante el almacenamiento refrigerado. A mayor valor de K menor frescura del pescado. Este índice ha sido utilizado recientemente para correlacionar los valores del *Índice K* ha sido utilizado recientemente para correlacionar los valores obtenido a través del espectro de ^1H -RMN, con los valores obtenidos a través del método tradicional.²⁰⁴ Es importante destacar que los nucleótidos y sus derivados poseen una influencia importante en el sabor del producto alimentario y por tanto, los cambios en la concentración de estos compuestos afectan al sabor y flavour del producto final.

La detección de los **osmolitos** y más concretamente de ciertas metilaminas tiene una gran relevancia en el análisis de alimentos como indicadores del deterioro del pescado. Así, el singlete que aparece a 2.91 ppm

²⁰³ Saito, T.; Arai, K.I.; Matsuyoshi, M. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **1959**, 24, 749-750.

²⁰⁴ Heude, C.; Lemasson, E.; Elbayed, K.; Piotto, M. *Food Anal. Method* **2014**, 8, 907-915.

(señal 54) en el espectro de ^1H RMN/HRMAS de músculo de salmón ahumado (**Trabajo 4**), permitió identificar la presencia de trimetilamina (TMA), responsable del olor desagradable en el pescado. El óxido de trimetilamina (OTMA), que se degrada a TMA durante el almacenamiento, juega un papel muy importante en la regulación osmótica de los biofluidos y su presencia por el contrario está asociada a un buen estado de conservación. Por ello, tanto la detección del singlete correspondiente al OTMA como el de la TMA, son de especial interés en estudios de la frescura en el pescado. En el **Trabajo 4** se muestra cómo el análisis directo de los músculos intactos permite la identificación y cuantificación relativa de estos compuestos. El OTMA y la TMA también fueron identificados en las muestras de exudado de salmón fresco (**Trabajo 6**). En estas muestras, las diferencias entre los valores de OTMA durante el almacenamiento (hasta 12 días) no fueron significativas, mientras que la TMA mostró una muy sutil pero significativa ($p < 0.05$), disminución entre el día 1 y el resto de los tiempos de almacenamiento (6 y 12 días). Esta pequeña disminución de la TMA en el inicio del almacenamiento no fue tomada en cuenta pues algunos artículos publicados con anterioridad ya describían una mínima variación de la TMA durante los primeros quince días de almacenamiento.^{205,206} Además, se sabe que las pequeñas variaciones de OTMA y TMA durante el almacenamiento podrían estar relacionadas con muchos factores como el pH o la microbiota detectada en el pescado. Trabajos previos también han descrito el empleo del espectro de ^1H -RMN para evaluar si las muestras habían sido congeladas, ya que, en esas condiciones de conservación la conversión bacteriana de OTMA a TMA es reemplazada por una reacción enzimática lenta, que conduce a la formación de dimetilamina (DMA) y formaldehído.²⁰⁷

Otra de las clases más importantes de metabolitos que influyen en el sabor, son los **aminoácidos libres**. Algunos de los aminoácidos identificados en el músculo de pescado como en el de carne, contribuyen al sabor dulce (tales como Gly, Ala, Ser, Thr), mientras que otros aportan a la muestra un sabor

²⁰⁵ Castro, P.; Padrón, J. C. P.; Cansino, M. J. C.; Velázquez, E. S.; Larriva, R. M. D. *Food Control* **2006**, *17*, 245-248.

²⁰⁶ Papadopoulos, V.; Chouliara, I.; Badeka, A.; Savvaidis, I.; Kontominas, M. *Food Microbiol.* **2003**, *20*, 411-420.

²⁰⁷ Martínez, I.; Bathen, T.; Standal, I. B.; Halvorsen, J.; Aursand, M.; Gribbestad, I. S.; Axelson, D. E. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6889-6895.

amargo (como Arg, Leu, Val, Met, Phe, His y Ile).²⁰⁸ En nuestro trabajo se describen pequeños cambios en las señales correspondientes a los aminoácidos durante los primeros días de almacenamiento pero, posteriormente, su concentración aumentó con rapidez especialmente en las muestras de ternera. Probablemente, en esta segunda fase, el deterioro bacteriano se hace más importante y la actividad de las bacterias acelera la velocidad de la proteólisis, con la consiguiente liberación de aminoácidos libres. En el **Trabajo 7** las muestras de exudado de ternera se clasificaron en dos grupos, muestras con tiempos de almacenamientos menores y mayores de dos semanas, para así poder observar qué regiones espectrales contribuían más a la clasificación de las muestras en PC1 de acuerdo a su tiempo *postmortem*. Los resultados mostraron que los principales aminoácidos que sufrieron cambios en su concentración durante la maduración de la carne fueron: valina (Val); isoleucina (Ile), alfa alanina (α -Ala), lisina (Lys), glutamina (Gln), glutamato (Glu), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y ácido gamma aminobutírico (GABA). La mayoría de estos aminoácidos aumentaron con el tiempo de almacenamiento pero alguno, como el Glu, disminuyó. Esta disminución del Glu fue asociada al aumento de Gln y de GABA. La degradación del Glu puede estar asociada a la presencia de ciertas bacterias capaces de metabolizar los aminoácidos libres. Como se describió en el primer trabajo de salmón ahumado (**Trabajo 4**) y posteriormente en muestras de ternera (**Trabajo 7**), el espectro de ¹H-RMN permitió seguir la formación de GABA a partir de Glu. Este hecho le da un peso adicional al espectro de resonancia debido al auge actual de los alimentos enriquecidos en GABA. La evolución del Glu a Gln y su posterior conversión en GABA, hasta donde los autores conocen, es la primera vez que se describe en un estudio mediante RMN.

Los **dipéptidos** derivados de la histidina, como son la carnosina y la anserina, estuvieron presentes en las muestras analizadas. Se identifican habitualmente a través de los singletes que presentan en la zona aromática correspondientes a los protones del anillo de la histidina. Son compuestos importantes por su capacidad tamponadora, en los que la posición de sus señales de RMN es sensible al pH. De hecho, se ha descrito que la anserina

²⁰⁸ Sikorski, Z. E.; Lolakowska A.; Pan, B. S. In *The nutritive composition of the major groups of marine food organisms*; Sikorski, Z. E., Ed.; Resources Nutritional Composition and Preservation; CRC Press-Inc: Boca Raton, 1990; pp 30–52.

podría utilizarse para medir el pH de una muestra en función de los valores de desplazamiento químico registrados en el espectro de ^1H -RMN.²⁰⁹ Estos compuestos también han destacado por jugar un importante papel frente a los procesos de oxidación gracias a sus propiedades como agentes quelantes y secuestrantes de radicales libres. La concentración relativa encontrada fue muy distinta: en muestras de salmón la señal de la anserina era mayoritaria, mientras que la señal de carnosina no fue detectada. Por el contrario, en muestras cárnicas, la anserina estaba presente aunque a niveles sensiblemente inferiores que la señal de la carnosina. Tanto en muestras de pescado como de carne, los niveles encontrados de estos dipéptidos fueron constantes durante el almacenamiento.

Respecto a los **ácidos grasos** presentes en las muestras de salmón y de ternera, únicamente se observaron variaciones significativas en el nivel del ácido butírico en las muestras de exudado de ternera, que aumentó con el tiempo de envejecimiento. Este hecho posee correlación con la lipólisis que produce ácidos grasos libres, cuya autooxidación da como resultado la generación de ácidos grasos de cadena corta. La composición de los ácidos grasos presentes en los alimentos de origen animal es muy dependiente de la dieta y de las condiciones de cría²¹⁰ y esa fue la razón por la que en los experimentos sobre músculo de salmón ahumado (**Trabajos 4 y 5**), el análisis se centró sobre el miotomo y no sobre el mioseptum.

Otro grupo de compuestos que se producen durante el almacenamiento de los alimentos son las **aminas biógenas**. Las más significativas presentes en los alimentos son la histamina, la putrescina, la cadaverina, la tiramina, la triptamina, la 2-feniletilamina, la espermina, la espermidina y la agmatina.²¹¹ La presencia de tiramina se detectó en muestras de exudado de solomillo de ternera almacenadas durante 19 días. Este compuesto no había sido detectado previamente en estudios de RMN aplicados a matrices cárnicas. Aunque en la presente Tesis no se muestran los resultados obtenidos en muestras de salmón, en relación a la presencia de aminas biogénas, éstas han sido detectadas en muestras de exudado de salmón, trabajo que se sigue desarrollando en el grupo

²⁰⁹ Aursand, M.; Rainuzzo, J.; Grasdalen, H. J. *Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, 70, 971-981.

²¹⁰ Hsieh, S.; Hu, C.; Hsu, Y.; Hsieh, T. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **2007**, 147, 438-444.

²¹¹ Özogul, F.; Özogul, Y. *Food Chem.* **2006**, 99, 574-578.

de investigación. La importancia de las aminos biógenas radica en que son peligrosas para los consumidores, ya que, a diferencia de otros compuestos como el TMA, que están estrechamente relacionados con el desarrollo de olores desagradables, algunos de estos metabolitos como la histamina son inodoras pero tienen un efecto nocivo para los consumidores. En las muestras de exudado de salmón Atlántico fresco a 12 días de almacenamiento se observó la formación de tiramina y cadaverina debido a la descarboxilación de los aminoácidos tirosina y lisina, respectivamente, durante el almacenamiento post mortem. Ello le aporta un valor añadido a la información que se obtiene del espectro de ^1H -RMN. Entre las **vitaminas solubles** en agua solamente se encontró la niacina (vitamina B3) en las muestras de salmón y ternera analizadas.

La producción de alimentos seguros y sabrosos con un alto valor nutritivo requiere protocolos analíticos fiables, precisos y sensibles que puedan analizar simultáneamente muchos compuestos y procesos. Como ha quedado demostrado, la espectroscopía de RMN proporciona todas estas ventajas, aportando en unos pocos minutos un perfil molecular bien definido, con escasa manipulación de la muestra y permitiendo la aplicación del análisis mediante cribado de alto rendimiento. Puede así monitorizar los procesos de degradación que sufre la muestra durante su almacenamiento. En total, las señales asignadas y no asignadas constituyen un rico conjunto de biomarcadores (denominado perfil molecular), adecuados para seguir la pérdida de frescura del pescado y monitorizar los procesos de maduración de la carne. La espectroscopía de RMN proporciona una huella dactilar del alimento en cada momento. Los nuevos estudios desarrollados en nuestro grupo deberían incluir estudios de correlación con la calidad sensorial, nutricional y tecnológica.

IV.2.3. Aplicación al estudio de métodos de conservación: Tratamiento de irradiación con electrones acelerados (Trabajos 5 y 6).

Respecto al estudio del método de conservación de irradiación basado en el tratamiento con haces de electrones se estudiaron:

- Muestras de músculo de salmón ahumado (**Trabajo 5**). En este trabajo se analizaron muestras irradiadas mediante haces de electrones a 0, 1 y 4 KGy que fueron almacenadas a 4 °C entre 0 y 30 días.

- En el **Trabajo 6** se analizaron muestras de músculo y exudado de salmón fresco irradiadas a 0, 1, 2 y 6 KGy, que se almacenaron a 4 °C entre 1 y 12 días y se reprocesan las muestras de músculo de salmón ahumado estudiadas en el **Trabajo 5** incluyendo las muestras irradiadas a 8 KGy.

El salmón ahumado es uno de los productos pesqueros más populares del mundo y generalmente se comercializa loncheado y envasado en porciones como producto listo para el consumo (*ready to eat*, RTE). Las temperaturas utilizadas durante el procesamiento de estos productos no derivan en la inactivación microbiana, lo que permite el deterioro de la muestra y la proliferación de microorganismos patógenos durante el almacenamiento bajo refrigeración. De especial importancia es la posible presencia de *Listeria monocytogenes*, una bacteria detectada con frecuencia en el salmón ahumado en frío y que representa un problema importante para la salud humana si el patógeno alcanza niveles altos. Se trata de un microorganismo *psicrófilo*, de forma que su capacidad para crecer a bajas temperaturas es sumamente importante para los alimentos que se conservan en refrigeración como es el caso del salmón ahumado. Por este motivo, aún cuando no se detecte la presencia del microorganismo, éste puede aumentar a niveles peligrosos tras unos días de conservación en refrigeración, especialmente si se produce en ausencia de oxígeno. Se ha descrito en trabajos previos que, en plantas de procesamiento de salmón ahumado, muestras en las que no se detectó inicialmente la presencia de *listeria*, presentaron con posterioridad resultados positivos.^{212,213,214} Esto quiere decir que la eliminación de la bacteria durante algunos periodos de tiempo no supone una garantía de que posteriormente no se pueda reintroducir o multiplicar en el alimento y afectar al producto final.

La irradiación es uno de los métodos de conservación que permite reducir la carga microbiana y aumentar la seguridad de los alimentos. Se trata de un procedimiento eficaz contra la mayoría de las bacterias patógenas y parásitos prolongando con ello la vida útil del producto. Así, el tratamiento con electrones acelerados (radiación β) se emplea para aumentar la vida útil de los alimentos y obtener un producto final seguro sin alterar sus características

²¹² Lappi, V. R.; Ho, A.; Gall, K.; Wiedmann, M. C. J. *Food Prot.* **2004**, 67, 1022-1026.

²¹³ Eklund, M. W.; Peterson, M. E.; Poysky, F. T.; Paranjpye, R. N.; Pelroy, G. A. *J. Food Prot.* **2004**, 67, 347-351.

²¹⁴ Vogel, B. F.; Huss, H. H.; Ojeniyi, B.; Ahrens, P.; Gram, L. *Appl Environ Microbiol.* **2001**, 67, 2586-2595.

sensoriales. Pese a que la radiación β tiene un poder de penetración más bajo que la *radiación γ* y los *rayos X*, su efecto es suficiente para poder transmitirse a través de los materiales de envasado utilizados habitualmente en los alimentos RTE. De este modo, la aplicación del tratamiento de irradiación después del envasado del producto puede evitar los posibles riesgos de recontaminación.

La irradiación se ha propuesto como un método viable para extender la vida útil del pescado refrigerado y garantizar la calidad higiénica de los productos pesqueros mediante la reducción de la población microbiana; sin embargo, pocos estudios se han realizado en este campo. Por todo lo expuesto anteriormente, se estudió el efecto del tratamiento con electrones acelerados para incrementar la seguridad y la vida útil tanto del salmón ahumado en frío RTE como del salmón fresco. El estudio que se incluye en esta Tesis Doctoral comprendía los siguientes objetivos parciales: 1) evaluar sobre el espectro de ^1H -RMN de las muestras irradiadas la eficacia de este tratamiento para ralentizar los procesos de degradación observados en el **Trabajo 4** y determinar qué dosis de irradiación era requerida para producir una reducción significativa del deterioro y 2) determinar si el espectro de ^1H RMN permitía discernir muestras irradiadas de no irradiadas.

Como se mencionó anteriormente, una vez asignadas las señales del espectro del salmón ahumado en frío y descritos los procesos de degradación que se pueden monitorizar a través del espectro de ^1H -RMN como consecuencia del almacenamiento en refrigeración (4 °C), el paso siguiente se dirigió al estudio del efecto de la irradiación sobre las muestras de salmón ahumado como método de conservación. El estudio de las regiones espectrales más sensibles a la degradación (descritas en el apartado IV.2.2 de la discusión integradora y en el **Trabajos 4**), mostró que el tratamiento con electrones acelerados tenía un efecto conservador sobre la muestra almacenada entre 0 y 30 días (**Trabajo 5**). La dosis mínima evaluada en este trabajo, 1 KGy, resultó ser efectiva para retrasar las alteraciones microbianas y por tanto para alargar la vida útil del producto. Sólo en el último día de almacenamiento estudiado, 30 días, se apreció una leve variación en las señales correspondientes a los nucleótidos y a los carbohidratos, que como ya se mencionó en el apartado anterior, representan metabolitos centinela respecto a la degradación. Los espectros de ^1H -RMN de las muestras sometidas a la otra dosis aplicada en el

Trabajo 5 (4 KGy) no mostraron cambios significativos en las señales de los carbohidratos y nucleótidos durante el periodo de almacenamiento analizado. Estos resultados están en concordancia por los descritos por Medina et al., en los que a través del análisis microbiológico se recomendó el tratamiento de salmón ahumado en frío con una dosis de 1.5 KGy para poder obtener “*Food Safety Objective*” y la eliminación de *L. monocytogenes* en muestras almacenadas durante 35 días a 5 °C.²¹⁵ Además, en el trabajo realizado por Montiel et al., que evaluó los cambios sensoriales de color y textura, se sugiere que la dosis de irradiación de 1.5 kGy, no producía cambios sensoriales en el salmón ahumado que pudieran ser detectados por el consumidor final.²¹⁶ Parece por tanto que la dosis de radiación beta de 1.5 kGy permite alargar la vida del producto sin alterar las condiciones organolépticas.

En el **Trabajo 6** se analizaron muestras de músculo y de exudado de

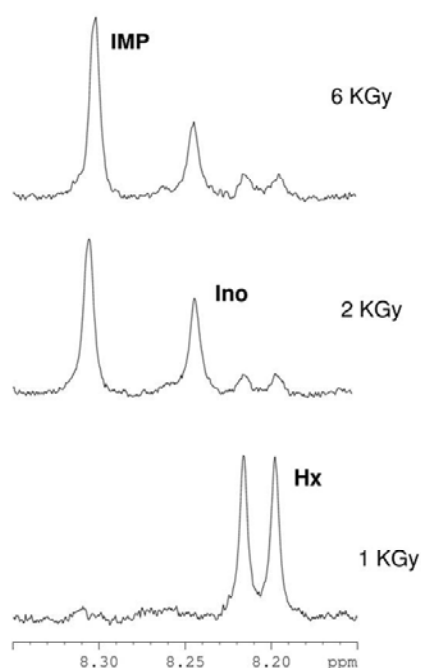


Figura IV.3. Ampliación de la región del espectro ^1H -RMN entre 8.15 y 8.35 ppm de muestras de salmón fresco almacenadas durante 12 días en frío (4 °C) e irradiadas con radiación beta a 1, 2 y 6 KGy.

salmón Atlántico fresco. Como se describió en el trabajo y en el apartado anterior de la discusión integradora, los espectros de exudado almacenados a diferentes tiempos permitieron observar los mismos procesos de degradación que se observaron sobre las muestras de salmón ahumado en frío. Como se sabe, el ahumado afecta al aroma, al color y al sabor y respecto a la conservación, produce un retardo en las alteraciones microbianas. Así, a los 6 días, los espectros de exudado de salmón fresco únicamente mostraban la señal de la Hx, ya que toda la IMP y la Ino se habían degradado. Además, la dosis mínima utilizada (1 kGy) no mostró el efecto conservador observado en las muestras de salmón ahumado. La **Figura IV.3** muestra la ampliación de los espectros de ^1H -RMN obtenidos a partir

²¹⁵ Medina, M.; Cabeza, M.; Bravo, D.; Cambero, I.; Montiel, R.; Ordóñez, J.; Núñez, M.; Hoz, L. *Food Microbiol.* **2009**, 26, 224-227.

²¹⁶ Montiel, R.; Cabeza, M.; Bravo, D.; Gaya, P.; Cambero, I.; Ordoñez, J.; Núñez, M.; Medina, M. *Food Bioprocess Tech.* **2013**, 6, 3177-3185.

de exudados de salmón fresco almacenados durante 12 días tras su tratamiento con 1, 2 y 6 kGy. Como puede apreciarse, la dosis de 2 kGy tuvo un efecto conservador muy similar al obtenido para una dosis sensiblemente mayor (6 KGy). Esto estaría en concordancia con el hecho de que las muestras de salmón ahumado tienen un doble proceso conservador, el ahumado y la irradiación, y por tanto las dosis efectivas para este sustrato deberían ser menores que las esperadas para una muestra de salmón fresco que previsiblemente tendrá mayor carga bacteriana.

Como se ha puesto de manifiesto, y era de esperar, la dosis de irradiación necesaria para conseguir el beneficio buscado en cada producto depende de sus características. Por otra parte, las legislaciones existentes en los diferentes países en relación con el tipo de alimento y la dosis que puede aplicarse son diferentes, lo que dificulta notablemente el control normativo de este tratamiento en un mercado global. Los métodos de detección de alimentos irradiados se están desarrollando de forma continua y su detección se ha basado principalmente en la radiolisis de los lípidos y las modificaciones producidas en aminoácidos, ADN, hidratos de carbono así como en la formación de radicales libres, la liberación de hidrógeno, los cambios de la microbiota y en otros métodos físicos.^{217,218} Desafortunadamente, ninguno de estos métodos se puede aplicar a todos los sistemas alimentarios. Los diferentes alimentos varían en su composición química y propiedades físicas. Además, la selección de un método adecuado de detección depende en general del tipo de alimento, la dosis de irradiación utilizada, el grado de precisión requerido y el costo. Cada vez resulta más evidente que solamente una combinación de métodos analíticos puede resolver el problema de la detección (cualitativa y cuantitativa) de los productos alimentarios irradiados, tanto desde el punto de vista científico como práctico. Para facilitar el control e inspección de los productos irradiados, es importante disponer de métodos analíticos que permitan detectar si la muestra ha sido irradiada y poder cuantificar la dosis aplicada. Un método de detección ideal debería medir el efecto de la radiación específica, mantener una proporcionalidad con la dosis aplicada y no debería verse afectado por los procesos de transformación y las condiciones de almacenamiento durante el

²¹⁷ Guillén-Casla, V.; León-González, M. E.; Pérez-Arribas, L. V.; Polo-Díez, L. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 63-75.

²¹⁸ Chauhan, S. K.; Kumar, R.; Nadasabapathy, S.; Bawa, A. S. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2009**, 8, 4-16.

tiempo transcurrido entre la aplicación del tratamiento de irradiación y el análisis.

Los métodos analíticos modernos que realizan el análisis de componentes múltiples, combinado con la quimiometría, podrían ser una solución a este problema complejo. Como se mencionó anteriormente en los **Trabajos 5 y 6**, se observó el efecto del tratamiento con radiación beta. En las muestras irradiadas ciertos metabolitos descritos previamente (**Trabajo 4**) no se degradan con el almacenamiento debido al efecto conservador de la irradiación. Este dato podría utilizarse como indicador indirecto de que una muestra ha sido irradiada, pero se necesitaría tener mucha información de la muestra para poder asegurarlo y no sería efectivo para un control de calidad global. Una vez constatado que el tratamiento con radiación beta se podía deducir del espectro de ^1H -RMN, el otro gran objetivo del **Trabajo 5** fue intentar diferenciar entre muestras irradiadas y no irradiadas a tiempo cero de almacenamiento. La simple inspección visual no mostró diferencias entre los espectros de muestras tratadas y no tratadas. Para intentar diferenciar entre las muestras de salmón irradiadas y no irradiadas, se recurrió a la utilización de técnicas quimiométricas que nos permitieran seleccionar aquellos datos espectrales capaces de diferenciar entre los dos tipos de muestras y se aplicó un método no supervisado de clasificación. El análisis por componentes principales (PCA) permitió reducir la dimensionalidad de la matriz de datos de tal manera que las variables originales (es decir, las señales de RMN), se transformaron en un menor número de nuevas variables latentes, denominadas componentes principales (PCs), que no están correlacionados entre sí. La mejor clasificación entre muestras irradiadas y no irradiadas se obtuvo seleccionando la región espectral correspondiente a los aminoácidos donde el componente principal PC1 explicaba el 89.47% de la varianza. El análisis de la varianza de los datos de PC1 permitió discriminar de forma significativa entre muestras irradiadas y no irradiadas, aunque no diferenció entre las muestras irradiadas a 1 KGy y las irradiadas a 4 KGy. La aplicación del PCA utilizando otras técnicas de detección ya había sido reportado con éxito en diferentes matrices alimentarias irradiadas con radiación beta por Guillén-Casla et al.²¹⁹ En nuestro análisis de componentes

²¹⁹ Guillén-Casla, V.; Rosales-Conrado, N.; León-González, M. E.; Pérez-Arribas, L. V.; Polo-Díez, L. M. J. *Food Compos. Anal.* **2011**, 24, 456-464.

principales se pudieron identificar aquellos segmentos espectrales (buckets) que contribuían en mayor extensión en la separación entre muestras irradiadas y no irradiadas. Así, se observó que las principales señales de resonancia que fueron significativamente diferentes entre muestras irradiadas y no irradiadas, procedían de grupos unidos a átomos de nitrógeno. Los principales metabolitos que mejor discriminan entre muestras irradiadas y no irradiadas fueron creatina (Cr), OTMA y PCho/GPCho (fosfocolina/glicerofosfocolina). Ello permite una rápida clasificación de las muestras irradiadas y no irradiadas, teniendo en cuenta que el análisis de las muestras por HRMAS requiere unos 5 minutos de preparación de muestra y unos 7 minutos de adquisición del espectro de ^1H -RMN. Por el contrario, el análisis de los espectros no permitió observar ninguno de los subproductos derivados de los cambios lipídicos ni de la alteración de los aminoácidos aromáticos, descritos anteriormente por diversos autores.²²⁰ Seguramente estos compuestos no fueron observados en el espectro de ^1H -RMN por la dosis aplicada, porque estaban a una concentración muy baja o porque quedaban solapados con las intensas señales de los ácidos grasos registradas en el espectro de ^1H -RMN/HRMAS. Esta es una de las razones por las que se buscaron nuevas matrices de análisis que permitieran evaluar el espectro completo. Por ello se comenzaron a estudiar las muestras de exudado. El estudio de las muestras irradiadas a través del exudado se centró inicialmente en el análisis de los derivados de metilamina como familia de compuestos, ya que según resultados anteriores podrían tener una influencia importante a la hora de discernir entre muestras irradiadas y no irradiadas. Así, se analizó la evolución de la señal del OTMA y TMA, previamente identificadas en los espectros de salmón ahumado y se intentó identificar la señal de la DMA asociada a degradación enzimática. Otro metabolito asociado a la degradación del OTMA es la monometilamina (MMA), que nunca había sido descrito (hasta donde los autores conocen) en ninguno de los trabajos que utilizan la RMN en estudios de pescado. En alguno de los espectros de salmón adquiridos se observó un singlete que se correspondía con el desplazamiento químico que le asignaban las bases de datos a la MMA. Después de confirmar la asignación, se integraron las señales pertenecientes a las tres aminas detectadas para poder evaluar así el efecto de la irradiación. Los resultados obtenidos para la MMA

²²⁰ Chauhan, S. K.; Kumar, R.; Nadasabapathy, S.; Bawa, A. S. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2009**, 8, 4-16.

fueron muy prometedores pues su concentración demostró ser dependiente de la dosis aplicada e independiente del tiempo de almacenamiento, lo que la convierte en una señal a tener muy en cuenta para el control de pescado irradiado, especialmente porque este efecto observado sobre el pescado fresco también se observó en las muestras de salmón ahumado utilizadas en el **Trabajo 5** y en las muestras de músculo fresco del **Trabajo 6**. Todas las muestras irradiadas mostraron la señal correspondiente a la MMA, frente a las muestras no irradiadas en las que esta señal no estuvo presente.

IV.2.4. Aplicación al estudio de procesos de oxidación. (Trabajo 3)

Respecto al estudio del proceso de termooxidación en aceites vegetales se analizaron:

- Muestras de aceite de oliva, cardo y girasol (**Trabajo 3**) que se sometieron a un proceso de oxidación térmico entre 0 y 36 horas.

Después de optimizar el análisis de los aceites vegetales mediante ^1H -RMN (**Trabajo 1**) y conseguir la automatización del método a bajo campo (**Trabajo 2**), se procedió a aplicar esta metodología en la monitorización del proceso de fritura de aceites comestibles, estudiando además la posible revalorización del aceite de cardo (**Trabajo 3**). En este desarrollo se emplearon las espectroscopías de RMN y de REE. Durante el proceso de termooxidación, la RMN permitió monitorizar la composición de los ácidos grasos presentes en los tres aceites analizados (oliva, cardo y girasol), utilizándose para ello las ecuaciones seleccionadas en el **Trabajo 1**. Se observó que al aumentar el tiempo de oxidación, los aceites sufrieron cambios en su composición, al reducir su porcentaje de ácidos grasos insaturados y aumentar el porcentaje de saturados. Pero además, la RMN permitió monitorizar la formación de nuevos compuestos derivados de la oxidación. Gracias al espectro de ^1H -RMN, fue posible identificar y evaluar la formación de aldehídos y de epóxidos como subproductos secundarios del tratamiento térmico. Por el contrario, los compuestos de degradación primaria formados durante el proceso de oxidación, los hidroperóxidos, no se observaron ya que se degradan rápidamente en aldehídos al trabajar a altas temperaturas (160 °C). Estos resultados están en sintonía con los reflejados en trabajos previos, en los que las señales correspondientes a los hidroperóxidos no fueron observadas cuando se trabajaba a las altas

temperaturas de fritura (de 160 a 190 °C), pero sí, al analizar muestras de aceite sometidas a procesos térmicos menos severos (70 - 100 °C).^{221,222} Por otro lado, las rutas de degradación de los epóxidos no están claras y parecen no estar correlacionadas con la formación y degradación de los hidroperóxidos. No obstante, se espera que en un futuro cercano sea posible obtener una información más detallada de las reacciones de oxidación y de los subproductos derivados que se originan durante la fritura mediante RMN. Hoy en día existen nuevas alternativas para la realización de este tipo de estudios; quizás la más prometedora sea la aplicación de la RMN ultrarrápida (*UF-NMR*), que podría aportar nuevos datos en la detección y el estudio de los intermedios de reacción que se producen durante el proceso de termooxidación de los aceites vegetales. Esta nueva metodología ha sido desarrollada por el grupo de Lucio Frydman,²²³ y aplicada muy recientemente en diferentes ámbitos analíticos de interés por los grupos de Patrick Giraudeau^{225,226} y de Antonio Herrera.^{227,228,229} En nuestro estudio se pudieron identificar las señales correspondientes a los aldehídos y los epóxidos en el espectro de ¹H-RMN después de tan sólo una hora de tratamiento térmico. Tanto los aldehídos como los epóxidos fueron identificados en los tres aceites y su evolución fue monitorizada durante todo el proceso, observándose diferencias en los subproductos generados. El aceite de girasol presentó los mayores niveles de aldehídos mientras que los menores se encontraron en el aceite de oliva. En relación a los epóxidos, el comportamiento también fue diferente entre los aceites analizados. Los aceites de oliva y de girasol mostraron unos resultados similares, mientras que el nivel de epóxidos generados en el aceite de cardo fue sensiblemente inferior. Este comportamiento dispar parece incidir en las distintas rutas de formación que pueden presentarse en la génesis de estos compuestos, aldehídos y epóxidos.

²²¹ Guillén, M.; Uriarte, P. *Food Chem.* **2012**, *134*, 162-172. Miyake, Y.; Yokomizo, K.; Matsuzaki, N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 15-19.

²²² Goicoechea, E.; Guillén, M. D. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6234-6245.

²²³ Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15858-15862.

²²⁴ Frydman, L.; Gal, M. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/mrc.4271.

²²⁵ Giraudeau, P.; Frydman, L. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 129-161.

²²⁶ Guennec, A. L.; Giraudeau, P.; Caldarelli, S. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5946-5954.

²²⁷ Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E.; Gal, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6274-6277.

²²⁸ Pardo, Z. D.; Olsen, G. L.; Fernández-Valle, M. E.; Frydman, L.; Martínez-Álvarez, R.; Herrera, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2706-2715.

²²⁹ Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero-Vílchez, D.; Pardo-Botero, Z. D.; Sáez-Barajas, E. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/mrc.4240.

La estabilidad oxidativa de cada uno de los tres aceites fue estudiada a través del índice de iodo, calculado a partir de la integración de la señal de los protones olefínicos del espectro de ^1H -RMN y de los valores obtenidos de los espectros de REE, en los que la señal que se cuantificó fue la correspondiente al radical Galvinoxilo remanente. Los resultados del índice de iodo estuvieron en consonancia con los previamente descritos en la literatura, que indicaron un descenso durante la termooxidación de los tres aceites estudiados.²³⁰ Por otra parte, los valores obtenidos mediante REE mostraron dos claros comportamientos, seguramente asociados a la composición de los ácidos grasos y a la cantidad de antioxidantes presentes en los aceites. El aceite de oliva presentó un cambio brusco después de una hora de fritura y posteriormente permaneció estable. En cambio, los aceites de girasol y de cardo manifestaron los primeros cambios significativos después de seis horas de calentamiento. Una vez analizados los datos, se comprobó que los valores correspondientes a los aldehídos totales obtenidos a través del espectro de ^1H -RMN, correlacionaban significativamente ($p < 0.05$) con los datos derivados del espectro de REE.

Así pues, el comportamiento del aceite de cardo fue positivo en relación a la degradación de sus ácidos grasos, la formación de subproductos formados durante el tratamiento térmico y su estabilidad frente a la oxidación, por lo que se propone como un aceite con un potencial interés como aceite de fritura.

IV.3. Avances en la automatización del análisis mediante RMN Metabolómica de matrices alimentarias. (Trabajos 3, 5 y 7).

Contrariamente a lo ocurrido en otras técnicas de análisis, la espectroscopía de RMN no ha contado con un alto grado de automatización.²³¹ Lo habitual es que el usuario de la RMN sitúe las muestras y realice los experimentos de forma manual en el equipo. Sin embargo, en los últimos años, y debido sobre todo a la creciente demanda de estudios metabolómicos, se han producido notables mejoras de la técnica para incrementar su rendimiento. En el **Trabajo 2** se describió la evaluación y optimización necesarias para la realización del análisis automático de aceites vegetales, mediante RMN a bajo campo, y así poder obtener de forma rápida la composición de los ácidos grasos

²³⁰ Miyake, Y.; Yokomizo, K.; Matsuzaki, N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 15-19

²³¹ Monakhova, Y. B.; Schütz, B.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Kuballa, T.; Hahn, H.; Lachenmeier, D. W. *Accredit. Qual. Assur.* **2014**, *19*, 17-29.

(FAC). Para ello se desarrollaron varios programas que han permitido la automatización tanto del procesado como de la interpretación de los datos espectrales. Este proceso se realizó para los dos principales programas de software empleados en el análisis de los datos de RMN (*TopSpin* y *MestReNova*). El objetivo del trabajo era dar un importante paso en la automatización del análisis de la FAC mediante RMN. Para ello el estudio se realizó en un equipo de bajo campo (300 MHz), consiguiéndose que el proceso completo, desde la mínima preparación de muestra a la obtención del informe, requiera unos pocos minutos (~ 3 min). Por ello consideramos que la metodología descrita es altamente competitiva y puede llegar a convertirse en una técnica de gran aplicabilidad en el cribado de alto rendimiento, tanto en la industria como en los laboratorios de control alimentario.

Por otra parte, la combinación de la RMN con diversas técnicas de análisis estadístico, constituye una herramienta muy versátil para afrontar los distintos desafíos a los que se enfrenta la industria alimentaria y los que han de ocuparse del control de calidad. Cabe esperar que en un futuro próximo la RMN sea una pieza fundamental para la identificación de posibles contaminaciones alimentarias y la detección de fraudes en el etiquetado. Así por ejemplo, la reciente crisis de la leche infantil en polvo contaminada con *melanina*, ha señalado graves fallos en los actuales sistemas de control de los alimentos, puesto que en general se centran en el estudio específico de una serie de compuestos conocidos, previamente seleccionados. Debido a este enfoque dirigido, se pasó por alto durante mucho tiempo la presencia de melamina en productos lácteos infantiles. Desde la FAO se han reclamado herramientas de control que permitan garantizar la inocuidad de los alimentos para lactantes e incrementar su vigilancia.²³² Para evitar este tipo de crisis en el futuro, se propone el empleo de métodos de detección no dirigidos que aporten una visión global del alimento. Debido a ello, la RMN dispone de un potencial extraordinario que empieza a ser reconocido y explotado. Como se muestra en la figura IV.4 un simple análisis mediante ^1H -RMN a 400 MHz permite distinguir claramente entre leche de polvo libre de melamina y contaminada.²³³

²³² <http://www.fao.org/news/story/es/item/7640/icode/>

²³³ Lachenmeier, D. W.; Humpfer, E.; Fang, F.; Schütz, B.; Dvorsak, P.; Sproll, C.; Spraul, M. J. *Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 7194-7199.

Otro ejemplo exitoso, que ya se mencionó en la introducción, es la aplicación de esta metodología en el estudio de zumos de frutas. Como resultado de ello se ha desarrollado el equipo específico *Bruker JuiceScreener™* para *SGF Profiling™*.²³⁴ Desarrollos similares se encuentran actualmente en marcha para el análisis automático de muestras de vino y miel. Los análisis se fundamentan en extensas bases de datos, que permitan identificar valores anómalos de los diferentes metabolitos presentes y a partir de ahí, la obtención de las conclusiones oportunas acerca de la calidad, el origen y la seguridad del producto.

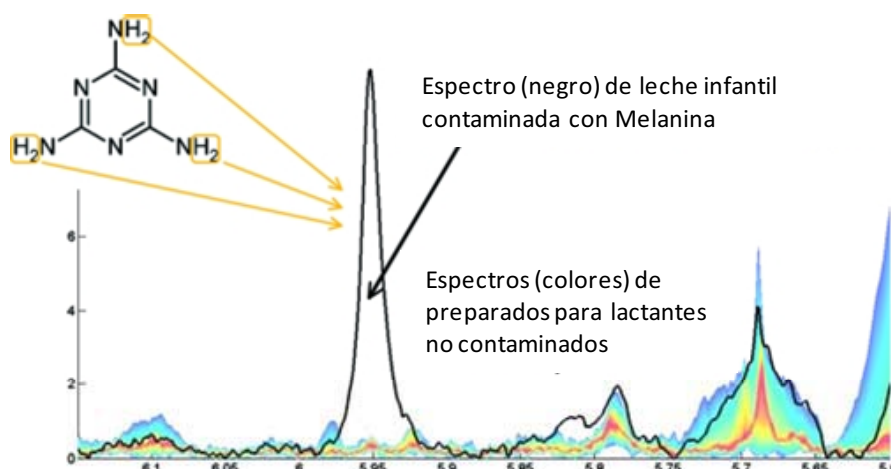


Figura IV.4. Comparación de los espectros de ^1H -RMN de diferentes muestras de leche en polvo para lactantes adquiridos a 400 MHz en $\text{DMSO-}d_6$. Como se observa en la región ampliada del espectro, la señal a 5.93 ppm, que se deriva de los grupos NH_2 de la melamina, permite identificar si una muestra está contaminada con ella.²³⁵

El avance que se ha realizado en el análisis de aceites mediante RMN permitiría el cribado masivo de este producto de alto valor comercial, proporcionando, además del perfil de ácidos grasos, la posibilidad de detectar cualquier anomalía en su composición.

Para finalizar, el autor alberga la esperanza de que los científicos y tecnólogos especialistas en alimentos, sobre todo aquellos no familiarizados con la espectroscopía de RMN, la conozcan más en profundidad después de leer esta Tesis Doctoral. Sería fundamental que poseyeran la capacidad de poder

²³⁴ Spraul, M.; Schütz, B.; Rinke, P.; Koswig, S.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Mörtter, M.; Fang, F.; Marx, U.; Minoja, A. *Nutrients* **2009**, 1, 148-155.

²³⁵ Lachenmeier, D. W.; Humpfer, E.; Fang, F.; Schütz, B.; Dvorsak, P.; Sproll, C.; Spraul, M. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 7194-7199.

comprender las aplicaciones basadas en RMN, que para las matrices alimentarias se describen en la literatura y adquirieran los conocimientos básicos para considerarla en un diseño experimental. En definitiva que puedan discernir, entre las múltiples posibilidades, la metodología más adecuada para hacer frente a los problemas que deban resolver y que la RMN sea una herramienta de análisis más a considerar en sus futuros planteamientos de trabajo.

V.CONCLUSIONES

Los principales resultados del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se pueden resumir en las siguientes **conclusiones**:

1. La normalización y optimización del análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), permite obtener, sobre muestras integra, el perfil nutricional de ácidos grasos de aceites vegetales en tiempos inferiores a 1 minuto.

2. Se ha conseguido automatizar el análisis del perfil de ácidos grasos y de otros metabolitos de los aceites vegetales incluso en equipos de RMN de bajo campo. Para ello, se han desarrollado dos programas en los principales software utilizados en RMN (MestReNova y TopSpin), que permiten el automatismo del procesado y el cálculo de estos componentes. El análisis completo, desde la mínima preparación de la muestra a la obtención del informe, requiere alrededor de 3 minutos. Este procedimiento, se ofrece como una técnica alternativa para el análisis no dirigido de aceites en el cribado de alto rendimiento para el control, la caracterización y la detección de fraudes y alteraciones.

3. La Resonancia Magnética de Nuclear de protón (^1H -RMN) y la Resonancia de Espín Electrónico (REE) son técnicas eficaces para monitorizar la degradación y la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales frente a la fritura. Ambas técnicas, ofrecen información complementaria que es posible correlacionar a través del contenido de aldehídos totales obtenidos del espectro de ^1H -RMN, como estimación de la degradación y de la cantidad del radical Galvinoxilo libre determinado por REE, como medida indirecta de la estabilidad oxidativa.

4. El aceite de Cardo (*Cynara cardunculus* L.) presenta un perfil de ácidos grasos con un elevado contenido en ácido linoleico (C18:2 ω 6), adecuado para el consumo saludable y una estabilidad oxidativa frente al tratamiento térmico similar a otros aceites comerciales, que le confieren un potencial para su uso como aceite comestible

5. Se ha incrementado notablemente mediante RMN el número de metabolitos identificados presentes en diferentes matrices alimentarias. Las tablas de asignación generadas pueden simplificar el empleo de la RMN en el estudio de alimentos.

6. La RMN Metabolómica permite monitorizar los cambios producidos durante el almacenamiento de matrices alimentarias constituidas por miosistemas (carne y pescado). Con esta tecnología puede estimarse el tiempo de almacenamiento y evaluar el efecto conservador de diversos procesos aplicados en la industria alimentaria, como el tratamiento con radiaciones ionizantes.

7. Los espectros de RMN de los exudados liberados por la carne y el pescado son un fiel reflejo de los obtenidos de los músculos de los que provienen y permiten monitorizar los mismos procesos descritos en las muestras sólidas. Por tanto, se propone este material para el análisis quimiométrico no invasivo, con un elevado potencial para el estudio y control de carne y pescado con diversos fines.

8. La monometilamina puede utilizarse como indicador del tratamiento de irradiación del salmón fresco y ahumado en frío. Este metabolito se detecta mediante RMN únicamente en las muestras irradiadas, tanto en músculo como en exudado y es estable durante el almacenamiento del producto en toda la extensión de su vida útil.

Conclusión Final

La RMN Metabolómica presenta un elevado potencial para la monitorización de los procesos aplicados en la industria, la trazabilidad y el control de calidad de matrices alimentarias íntegras así como para la automatización de su análisis.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Almeida, C.; Duarte, I. F.; Barros, A.; Rodrigues, J.; Spraul, M.; Gil, A. M. Composition of beer by ^1H NMR spectroscopy: effects of brewing site and date of production. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 700-706.
- Aue, W.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.
- Aursand, M.; Gribbestad, I. S., Martinez, I. in Application in Chemistry, Biological and Marine Science, vol. 1 (Ed.: G. A. Webb), Springer: New York, 2006, 931.
- Aursand, M.; Rainuzzo, J.; Grasdalen, H. Quantitative high-resolution ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance of ω_3 fatty acids from white muscle of atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 971-981.
- Bales, J. R.; Higham, D. P.; Howe, I.; Nicholson, J. K.; Sadler, P. J. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin. Chem.* **1984**, *30*, 426-432.
- Bardet, M.; Foray, M. F.; Bourguignon, J.; Krajewski, P. Investigation of seeds with high-resolution solid-state ^{13}C NMR. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 733-738.
- Barison, A.; da Silva, C. W.; Campos, F. R.; Simonelli, F.; Lenz, C. A.; Ferreira, A. G. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ^1H NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 642-650.
- Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH, Weinheim 2004.
- Bloch, F. Nuclear induction. *Physical review* **1946**, *70*, 460.
- Cakova, V.; Urbain, A.; Antheaume, C.; Rimlinger, N.; Wehrung, P.; Bonté, F.; Lobstein, A. Identification of Phenanthrene Derivatives in *Aerides rosea* (Orchidaceae) Using the Combined Systems HPLC-ESI-HRMS/MS and HPLC-DAD-MS-SPE-UV-NMR. *Phytochem. Anal.* **2015**, *26*, 34-39.
- Caligiani, A.; Acquotti, D.; Palla, G.; Bocchi, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *585*, 110-119.
- Capitani, D.; Mannina, L.; Proietti, N.; Sobolev, A.; Tomassini, A.; Miccheli, A.; Di Cocco, M.; Capuani, G.; De Salvador, R.; Delfini, M. Monitoring of metabolic profiling and water status of Hayward kiwifruits by nuclear magnetic resonance. *Talanta* **2010**, *82*, 1826-1838.
- Castejón, D.; Villa, P.; Miralles, B.; Mengíbar, M.; Herrera, A. Aplicación de la resonancia magnética nuclear de alta resolución con ángulo mágico (HRMAS) en el estudio de la maduración del queso. *Alimentaria* **2008**, *395*, 93-94.
- Castejón, D.; García-García, A. B.; Santos, C.; Escudero, R.; Romero de Ávila, M.D.; Herrera, A.; Cambero M. I. Análisis metabólico del exudado de merluza (*Merlucius merlucius*). Potencial como indicador de conservación del pescado. VIII CONGRESO CYTA / CESIA **2015**. Badajoz.

- Castro, P.; Padrón, J. C. P.; Cansino, M. J. C.; Velázquez, E. S.; Larriva, R. M. D. Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* **2006**, *17*, 245-248.
- Cevallos-Cevallos, J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 557-566.
- Chauhan, S. K.; Kumar, R.; Nadanasabapathy, S.; Bawa, A. S. Detection Methods for Irradiated Foods. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 2009, *8*, 4-16.
- Choi, H.; Yoon, J.; Kim, Y.; Kwon, D. Y. Metabolomic profiling of Cheonggukjang during fermentation by ^1H NMR spectrometry and principal components analysis. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 263-266.
- Cifuentes, A. *Foodomics: Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition*; John Wiley & Sons: 2013; Vol. 52.
- Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Pergamon, Oxford 1999.
- Consonni, R.; Gatti, A. ^1H NMR studies on Italian balsamic and traditional balsamic vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3446-3450.
- Conway, T.; Cohee, R.; Smith, R. J. NMR moisture analyzer shows big potential. *Food Eng* **1957**, *29*, 80-82.
- Corte, L.; Tiecco, M.; Roscini, L.; De Vincenzi, S.; Colabella, C.; Germani, R.; Tascini, C.; Cardinali, G. FTIR metabolomic fingerprint reveals different modes of action exerted by structural variants of N-alkyltropinium bromide surfactants on *Escherichia coli* and *Listeria innocua* cells. *PLoS One* **2015**, *10*, e0115275.
- Craig, A.; Cloarec, O.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2262-2267.
- Cruz, K.; Fernández-Valle, M. E.; García-García, A. B.; Castejón, D.; Escudero, R.M.; Romero de Ávila; M.D.; Cambero, M.I. Relaxometry and MRI study of Manchego cheese during ripening and its relationship with rheological behavior. XII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance, **2014**, Cesena, Italia.
- Cubero-Leon, E.; Peñalver, R.; Maquet, A. Review on metabolomics for food authentication. *Food Res. Int.* **2014**, *60*, 95-107.
- Cuny, M.; Le Gall, G.; Colquhoun, I.; Lees, M.; Rutledge, D. Evolving window zone selection method followed by independent component analysis as useful chemometric tools to discriminate between grapefruit juice, orange juice and blends. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *597*, 203-213.
- Dickinson, W. Dependence of the F 19 nuclear resonance position on chemical compound. *Phys. Rev.* **1950**, *77*, 736.
- Duarte, I. F.; Barros, A.; Almeida, C.; Spraul, M.; Gil, A. M. Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1031-1038.

- Dunn, W. B.; Bailey, N. J.; Johnson, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* **2005**, *130*, 606-625.
- Ebbels, T. M.; Cavill, R. Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *55*, 361-374.
- Ehrman, T. M.; Barlow, D. J.; Hylands, P. J. Phytochemical databases of Chinese herbal constituents and bioactive plant compounds with known target specificities. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 254-263.
- Eklund, M.; Peterson, M.; Poysky, F.; Paranjpye, R.; Pelroy, G. Control of bacterial pathogens during processing of cold-smoked and dried salmon strips. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 347-351.
- Emsley, J.; Feeney, J. Forty years of progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *50*, 179-198.
- Emwas, A.; Luchinat, C.; Turano, P.; Tenori, L.; Roy, R.; Salek, R. M.; Ryan, D.; Merzaban, J. S.; Kaddurah-Daouk, R.; Zeri, A. C. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics* **2014**, 1-23.
- Ercolini, D.; Ferrocino, I.; Nasi, A.; Ndagijimana, M.; Vernocchi, P.; La Stora, A.; Laghi, L.; Mauriello, G.; Guerzoni, M. E.; Villani, F. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7372-7381.
- Erikson, U.; Standal, I. B.; Aursand, I. G.; Veliyulin, E.; Aursand, M. Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, 471-480.
- Escudero, R.; Valhondo, M.; Ordoñez, J. A.; de la Hoz, L.; Cabeza, M. C.; Velasco, R.; Cambero, M. I. Electron spin resonance (ESR) spectroscopy study of dry-cured ham treated with electron-beam. *Food Chem.* **2012**, *133*, 1530-1537.
- Fiehn, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics* **2001**, *2*, 155-168.
- Fiehn, O. Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155-171.
- Findeisen, M.; Berger, S. *50 and more essential NMR experiments: a detailed guide*. Wiley, Weinheim 2014.
- Fonnesbech Vogel, B.; Huss, H. H.; Ojeniyi, B.; Ahrens, P.; Gram, L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2586-2595.
- Frisch, R.; Stern, O. Über die magnetische Ablenkung von Wasserstoffmolekülen und das magnetische Moment des Protons. *I. Z. Phys.* **1933**, *85*, 4-16.
- Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, A. The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15858-15862.

- Gal, M.; Frydman, L. Multidimensional NMR spectroscopy in a single scan. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/mrc.4271.
- Galed Cerezuela, G. Avances Biopolímeros quitina/quitosano: obtención, optimización y caracterización funcional, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2005.
- García-Cañas, V.; Simó, C.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. Present and future challenges in food analysis: Foodomics. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10150-10159.
- Gibney, M. J.; Walsh, M.; Brennan, L.; Roche, H. M.; German, B.; van Ommen, B. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 497-503.
- Gil, A.; Duarte, I.; Cabrita, E.; Goodfellow, B.; Spraul, M.; Kerssebaum, R. Exploratory applications of diffusion ordered spectroscopy to liquid foods: an aid towards spectral assignment. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *506*, 215-223.
- Gili, J. *Introducción biofísica a la resonancia magnética*. Editado por Centre Diagnòstic Pedralbes. Barcelona **1993**.
- Giraudeau, P.; Silvestre, V.; Akoka, S. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: a tutorial review. *Metabolomics* **2015**, *11*, 1041-1055.
- Giraudeau, P.; Frydman, L. Ultrafast 2D NMR: an emerging tool in analytical spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 129-161.
- Goicoechea, E.; Guillen, M. D. Analysis of hydroperoxides, aldehydes and epoxides by ^1H nuclear magnetic resonance in sunflower oil oxidized at 70 and 100 degrees C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6234-6245.
- Graham, S. F.; Kennedy, T.; Chevallier, O.; Gordon, A.; Farmer, L.; Elliott, C.; Moss, B. The application of NMR to study changes in polar metabolite concentrations in beef longissimus dorsi stored for different periods post mortem. *Metabolomics* **2010**, *6*, 395-404.
- Greule, M.; Mosandl, A.; Hamilton, J. T.; Keppler, F. Comment on: "Authenticity and Traceability of Vanilla Flavors by Analysis of Stable Isotopes of Carbon and Hydrogen". *J. Agric. Food Chem.* **2015**.
- Grosso, C.; Jäger, A. K.; Staerk, D. Coupling of a High-resolution Monoamine Oxidase-A Inhibitor Assay and HPLC-SPE-NMR for Advanced Bioactivity Profiling of Plant Extracts. *Phytochem. Anal.* **2013**, *24*, 141-147.
- Guenneq, A. L.; Giraudeau, P.; Caldarelli, S. Evaluation of fast 2D NMR for metabolomics. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5946-5954.
- Guillen, M. D.; Uriarte, P. S. Contribution to further understanding of the evolution of sunflower oil submitted to frying temperature in a domestic fryer: study by ^1H nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7790-7799.
- Guillén, M.; Uriarte, P. Study by ^1H NMR spectroscopy of the evolution of extra virgin olive oil composition submitted to frying temperature in an industrial fryer for a prolonged period of time. *Food Chem.* **2012**, *134*, 162-172.

- Guillén-Casla, V.; León-González, M. E.; Pérez-Arribas, L. V.; Polo-Díez, L. M. Direct chiral determination of free amino acid enantiomers by two-dimensional liquid chromatography: application to control transformations in E-beam irradiated foodstuffs. *Anal. Bioanal. Chem* **2010**, *397*, 63-75.
- Guillén-Casla, V.; Rosales-Conrado, N.; León-González, M. E.; Pérez-Arribas, L. V.; Polo-Díez, L. M. Principal component analysis (PCA) and multiple linear regression (MLR) statistical tools to evaluate the effect of E-beam irradiation on ready-to-eat food. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 456-464.
- Günther, H. *NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry*; Wiley-VCH, Weinheim 2013.
- Gutowsky, H.; Hoffman, C. Chemical Shifts in the Magnetic Resonance of F 19. *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 110-111.
- Hahn, E. L. Nuclear induction due to free Larmor precession. *Phys. Rev.* **1950**, *77*, 297-298.
- Halabalaki, M.; Vougiotiannopoulou, K.; Mikros, E.; Skaltsounis, A. L. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *25*, 1-7.
- Halouska, S.; Powers, R. Negative impact of noise on the principal component analysis of NMR data. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 88-95.
- Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E.; Gal, M. Real-Time Monitoring of Organic Reactions with Two-Dimensional Ultrafast TOCSY NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6274-6277.
- Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero-Vílchez, D.; Pardo-Botero, Z. D.; Sáez-Barajas, E. Monitoring organic reactions by UF-NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/mrc.4240.
- Herrero, A. M., Castejón, D., Hoz, L., Ordóñez, J. A., Cambero, M. I. 2010. Imagen de Resonancia magnética nuclear de salmón ahumado tratado con electrones acelerados. CESIA-CIBSA 2010. VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Logroño.
- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., versión española: Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Söllhuber, M., Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica, Editorial Síntesis S.A., Madrid, 2005.
- Heude, C.; Lemasson, E.; Elbayed, K.; Piotto, M. Rapid Assessment of Fish Freshness and Quality by ^1H HR-MAS NMR Spectroscopy. *Food Anal. Method* **2014**, *8*, 907-915.
- Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrieres, J.; Versali, M.; Rinaudo, M. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 746-751.
- Hills, B.; Manning, C.; Ridge, Y.; Brocklehurst, T. NMR water relaxation, water activity and bacterial survival in porous media. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *71*, 185-194.
- Holzgrabe, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, *57*, 229-240.

- Hoult, D.; Busby, S.; Gadian, D.; Radda, G.; Richards, R.; Seeley, P. Observation of tissue metabolites using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Nature* **1974**, *252*, 285-287.
- Hsieh, S.; Hu, C.; Hsu, Y.; Hsieh, T. Influence of dietary lipids on the fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase expression in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) under cold shock. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *147*, 438-444.
- Hu, F.; Furihata, K.; Kato, Y.; Tanokura, M. Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4307-4311.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. In H. H. Huss (Ed.). FAO fisheries technical paper No.338. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.
- Ibañez Ruiz, C. Desarrollo de nuevas estrategias metabolómicas y su aplicación en bioanálisis y “foodómica”, Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá, Julio de 2013.
- Izquierdo-García, J. L.; Villa, P.; Kyriazis, A.; del Puerto-Nevado, L.; Pérez-Rial, S.; Rodriguez, I.; Hernandez, N.; Ruiz-Cabello, J. Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *59*, 263-270.
- Jeener, J. Ampere International Summer School II, Basko Polje, Yugoslavia, 1971, (no publicado).
- Jézéquel, T.; Deborde, C.; Maucourt, M.; Zhendre, V.; Moing, A.; Giraudeau, P. Absolute quantification of metabolites in tomato fruit extracts by fast 2D NMR. *Metabolomics* **2015**, *11*, 1231-1242.
- Kaiser, K. A.; Barding, G. A.; Larive, C. K. A comparison of metabolite extraction strategies for ^1H -NMR-based metabolic profiling using mature leaf tissue from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 147-156.
- Keeler, J. Understanding NMR Spectroscopy, Wiley&Sons, Cambridge 2010.
- Kelly, A. E.; Ou, H. D.; Withers, R.; Dötsch, V. Low-conductivity buffers for high-sensitivity NMR measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12013-12019.
- Khatib, A.; Wilson, E. G.; Kim, H. K.; Lefeber, A. W.; Erkelens, C.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *559*, 264-270.
- Kim, H. K.; Verpoorte, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 4-13.
- Kim, H.; Choi, Y.; Verpoorte, R. In *Metabolomic analysis of Catharanthus roseus using NMR and principal component analysis*; Plant Metabolomics; Springer: Berlin Heidelberg, 2006; pp 261-276.
- Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 536-549.
- Korman, A.; Oh, A.; Raskind, A.; Banks, D. In *Statistical methods in metabolomics*; Anisimova, M., Ed.; Evolutionary Genomics; Springer: 2012; pp 381-413.

- Kortesniemi, M.; Vuorinen, A. L.; Sinkkonen, J.; Yang, B.; Rajala, A.; Kallio, H. NMR metabolomics of ripened and developing oilseed rape (*Brassica napus*) and turnip rape (*Brassica rapa*). *Food Chem.* **2015**, *172*, 63-70.
- Kwon, D.; Jeong, H.; Moon, H.; Kim, H.; Cho, J.; Lee, J.; Hong, K. S.; Hong, Y. Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a ^1H NMR-based metabolomics approach. *Food Res. Int.* **2015**, *67*, 175-182.
- Kwon, Y.; Bong, Y.; Lee, K.; Hwang, G. An integrated analysis for determining the geographical origin of medicinal herbs using ICP-AES/ICP-MS and ^1H NMR analysis. *Food Chem.* **2014**, *161*, 168-175.
- Lachenmeier, D. W.; Humpfer, E.; Fang, F.; Schütz, B.; Dvortsak, P.; Sproll, C.; Spraul, M. NMR-spectroscopy for nontargeted screening and simultaneous quantification of health-relevant compounds in foods: the example of melamine. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7194-7199.
- Laghi, L.; Picone, G.; Capozzi, F. Nuclear magnetic resonance for foodomics beyond food analysis. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *59*, 93-102.
- Lappi, V. R.; Ho, A.; Gall, K.; Wiedmann, M. Prevalence and growth of *Listeria* on naturally contaminated smoked salmon over 28 days of storage at 4 C. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 1022-1026.
- Lauterbur, P. C. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* **1973**, *242*, 190-191.
- Lavine, B.; Workman, J. J. Chemometrics. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3365-3372.
- Le Gall, G.; Colquhoun, I. J.; Davis, A. L.; Collins, G. J.; Verhoeven, M. E. Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using ^1H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2447-2456.
- Lenz, E. M.; Wilson, I. D. Analytical strategies in metabonomics. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 443-458.
- Liang, Z.; Lauterbur, P. C. *Principles of magnetic resonance imaging*; SPIE Optical Engineering Press: New York, 2000.
- Lin, C. Y.; Wu, H.; Tjeerdema, R. S.; Viant, M. R. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics* **2007**, *3*, 55-67.
- Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Everett, J. R. Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn. Reson.* **2000**, *12*, 289-320.
- Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1075-1088.
- Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2001**, *39*, 1-40.

- Lopez-Sanchez, P.; De Vos, R.; Jonker, H.; Mumm, R.; Hall, R.; Bialek, L.; Leenman, R.; Strassburg, K.; Vreeken, R.; Hankemeier, T. Comprehensive metabolomics to evaluate the impact of industrial processing on the phytochemical composition of vegetable purees. *Food Chem.* **2015**, *168*, 348-355.
- Mallamace, D.; Corsaro, C.; Salvo, A.; Cicero, N.; Macaluso, A.; Giangrosso, G.; Ferrantelli, V.; Dugo, G. A multivariate statistical analysis coming from the NMR metabolic profile of cherry tomatoes (The Sicilian Pachino case). *Physica A* **2014**, *401*, 112-117.
- Mannina, L.; D'Imperio, M.; Capitani, D.; Rezzi, S.; Guillou, C.; Mavromoustakos, T.; Vilchez, M. D.; Fernandez, A. H.; Thomas, F.; Aparicio, R. ¹H NMR-based protocol for the detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11550-11556.
- Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. Liquid state 1H high field NMR in food analysis. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *66*, 1-39.
- Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Capitani, D.; Iaffaldano, N.; Rosato, M. P.; Ragni, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; D'Amico, I.; Coppola, R. NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta* **2008**, *77*, 433-444.
- Mansfield, P.; Grannell, P. K. NMR'diffraction'in solids? *Journal of Physics C: solid state physics* **1973**, *6*, L422.
- Marccone, M. F.; Wang, S.; Albabish, W.; Nie, S.; Somnarain, D.; Hill, A. Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 729-747.
- Martin, G.; Martin, M. In *The site-specific natural isotope fractionation-NMR method applied to the study of wines*; Wine Analysis; Springer: 1988; pp 258-275.
- Martin, G. G.; Wood, R.; Martin, G. J. Detection of added beet sugar in concentrated and single strength fruit juices by deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR method): collaborative study. *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 917-928.
- Martinez, I.; Bathen, T.; Standal, I. B.; Halvorsen, J.; Aursand, M.; Gribbestad, I. S.; Axelsson, D. E. Bioactive compounds in cod (*Gadus morhua*) products and suitability of ¹H NMR metabolite profiling for classification of the products using multivariate data analyses. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6889-6895.
- Mazzei, P.; Piccolo, A. ¹H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1620-1627.
- Mckay, R. T. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2011**, *38*, 197-220.
- Medina, M.; Cabeza, M.; Bravo, D.; Cambero, I.; Montiel, R.; Ordóñez, J.; Nuñez, M.; Hoz, L. A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 224-227.

- Melado-Herreros, A.; Fernández-Valle, M. E.; Barreiro, P. Non-Destructive Global and Localized 2D T1/T2 NMR Relaxometry to Resolve Microstructure in Apples Affected by Watercore. *Food and Bioprocess Technology* **2015**, *8*, 88-99.
- Minoja, A. P.; Napoli, C. NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. *Food Res. Int.* **2014**, *63*, 126-131.
- Miura, K.; Nakano, T. Analysis of mercerization process based on the intensity change of deconvoluted resonances of ^{13}C CP/MAS NMR: Cellulose mercerized under cooling and non-cooling conditions. *Materials Science and Engineering: C* **2015**, *53*, 189-195.
- Miyake, Y.; Yokomizo, K.; Matsuzaki, N. Rapid determination of iodine value by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 15-19.
- Moco, S.; Bino, R. J.; Vorst, O.; Verhoeven, H. A.; de Groot, J.; van Beek, T. A.; Vervoort, J.; de Vos, C. H. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 1205-1218.
- Monakhova, Y. B.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W. Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products. *J. Anal. Chem.* **2013**, *68*, 755-766.
- Monakhova, Y. B.; Mushtakova, S. P.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W. Investigation into the structural composition of hydroalcoholic solutions as basis for the development of multiple suppression pulse sequences for NMR measurement of alcoholic beverages. *Magn. Reson. Chem.* **2014**, *52*, 755-759.
- Monakhova, Y. B.; Schütz, B.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Kuballa, T.; Hahn, H.; Lachenmeier, D. W. Validation studies for multicomponent quantitative NMR analysis: the example of apple fruit juice. *Accredit. Qual. Assur.* **2014**, *19*, 17-29.
- Montiel, R.; Cabeza, M.; Bravo, D.; Gaya, P.; Cambero, I.; Ordoñez, J.; Nuñez, M.; Medina, M. A Comparison Between E-Beam Irradiation and High-Pressure Treatment for Cold-Smoked Salmon Sanitation: Shelf-Life, Colour, Texture and Sensory Characteristics. *Food and Bioprocess Tech.* **2013**, *6*, 3177-3185.
- Morris, K. F.; Johnson Jr, C. S. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139-3141.
- Müller, V. In Bacterial Fermentation; John Wiley&Sons: Chichester. U.K., 2008. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001415.pub2.
- Mutungi, C.; Passauer, L.; Onyango, C.; Jaros, D.; Rohm, H. Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 598-606.
- Nambiar, P. R.; Gupta, R. R.; Misra, V. An "Omics" based survey of human colon cancer. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* **2010**, *693*, 3-18.
- Nicholson, J. K.; Foxall, P. J.; Spraul, M.; Farrant, R. D.; Lindon, J. C. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 793-811.
- Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* **1999**, *29*, 1181-1189.

- Ninonuevo, M. R.; Park, Y.; Yin, H.; Zhang, J.; Ward, R. E.; Clowers, B. H.; German, J. B.; Freeman, S. L.; Killeen, K.; Grimm, R. A strategy for annotating the human milk glycome. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7471-7480.
- Official Journal of the European Communities. *Off. J. Eur. Commun.* **1991**; *L214*, 39-43.
- Ohno, A.; Oka, K.; Sakuma, C.; Okuda, H.; Fukuhara, K. Characterization of tea cultivated at four different altitudes using ^1H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5181-5187.
- Oliver, S. G.; Winson, M. K.; Kell, D. B.; Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 373-378.
- Otto, G.; Roehe, R.; Looft, H.; Thoelking, L.; Knap, P. W.; Rothschild, M. F.; Plastow, G. S.; Kalm, E. Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. *Meat Sci.* **2007**, *75*, 185-195.
- Özogul, F.; Özogul, Y. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chem.* **2006**, *99*, 574-578.
- Papadopoulos, V.; Chouliara, I.; Badeka, A.; Savvaidis, I.; Kontominas, M. Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiol.* **2003**, *20*, 411-420.
- Pardo, Z. D.; Olsen, G. L.; Fernández-Valle, M. E.; Frydman, L.; Martínez-Álvarez, R.; Herrera, A. Monitoring mechanistic details in the synthesis of pyrimidines via real-time, ultrafast multidimensional NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2706-2715.
- Peiretti, P. G.; Medana, C.; Visentin, S.; Giancotti, V.; Zunino, V.; Meineri, G. Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1939-1947.
- Pizzoferrato, L.; Manzi, P.; Bertocchi, F.; Fanelli, C.; Rotilio, G.; Paci, M. Solid-state ^{13}C CP MAS NMR spectroscopy of mushrooms gives directly the ratio between proteins and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5484-5488.
- Proctor, W.; Yu, F. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. *Phys. Rev.* **1950**, *77*, 717.
- Puchades Carrasco, L. *Aplicaciones de la RMN a la identificación de nuevos biomarcadores de utilidad clínica en oncología*, Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, diciembre de 2013.
- Purcell, E. M.; Torrey, H.; Pound, R. V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37.
- Putri, S. P.; Yamamoto, S.; Tsugawa, H.; Fukusaki, E. Current metabolomics: technological advances. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *116*, 9-16.

- Rabi, I.; Millman, S.; Kusch, P.; Zacharias, J. The Molecular Beam Resonance Method for Measuring Nuclear Magnetic Moments. The Magnetic Moments of ${}^6\text{Li}$, ${}^7\text{Li}$ and ${}^{19}\text{F}$. *Phys. Rev.* **1939**, *55*, 526-535.
- Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2012–2014. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 212-224.
- Righi, V.; Mucci, A.; Schenetti, L.; Tosi, M. R.; Grigioni, W. F.; Corti, B.; Bertaccini, A.; Franceschelli, A.; Sanguedolce, F.; Schiavina, R.; Martorana, G.; Tugnoli, V. Ex vivo HR-MAS magnetic resonance spectroscopy of normal and malignant human renal tissues. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 3195-3204.
- Rinard, G. A.; Quine, R. W.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R. Frequency dependence of EPR signal intensity, 250 MHz to 9.1 GHz. *J. Magn. Reson.* **2002**, *156*, 113-121.
- Ryan, D.; Robards, K. Metabolomics: the greatest omics of them all? *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7954-7958.
- Saito, T.; Arai, K.; Matsuyoshi, M. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **1959**, *24*, 749-750.
- Sánchez-Ferrando, F. "Breve resumen histórico de la resonancia magnética nuclear." http://www.germn.org/documentacion/cat_view/4-cursos/7-presentaciones-de-la-escuela-de-verano-curso-avanzado-de-resonancia-magnetica-nuclear-jaca-2005?start=10
- Sánchez-Mendoza, J.; Castejón, D., E.; Márquez, O.; Cambero M. I. Análisis Nutricional y Caracterización por RMN del Extracto Acuoso de los Pétalos de Erythrina Coralloides. ACOFESAL **2013**. II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria, Madrid.
- Savorani, F.; Picone, G.; Badiani, A.; Fagioli, P.; Capozzi, F.; Engelsen, S. B. Metabolic profiling and aquaculture differentiation of gilthead sea bream by ${}^1\text{H}$ NMR metabonomics. *Food Chem.* **2010**, *120*, 907-914.
- Scalbert, A.; Andres-Lacueva, C.; Arita, M.; Kroon, P.; Manach, C.; Urpi-Sarda, M.; Wishart, D. Databases on food phytochemicals and their health-promoting effects. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4331-4348.
- Schaich, K. M. EPR methods for detecting and identifying free radicals in foods. Chemistry, Nutrition, and Health, American Chemical Soc, Washington, D.C, 2002; pp 12-34.
- Schievano, E.; Pasini, G.; Cozzi, G.; Mammi, S. Identification of the production chain of Asiago d'Allevio cheese by nuclear magnetic resonance spectroscopy and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7208-7214.
- Schlotterbeck, G.; Ceccarelli, S. M. LC-SPE-NMR-MS: a total analysis system for bioanalysis. *Bioanalysis* **2009**, *1*, 549-559.
- Schmidt, C. W. Metabolomics: what's happening downstream of DNA. *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 410-415.
- Sedman, J.; Gao, L.; García-González, D.; Ehsan, S.; van de Voort, F. R. Determining nutritional labeling data for fats and oils by ${}^1\text{H}$ NMR. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **2010**, *112*, 439-451.

- Shumilina, E.; Ciampa, A.; Capozzi, F.; Rustad, T.; Dikiy, A. NMR approach for monitoring post-mortem changes in Atlantic salmon fillets stored at 0 and 4° C. *Food Chem.* **2015**, *184*, 12-22.
- Sikorski, Z. E.; Kotakowska, A.; Pan, B. S. The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. *Seafood: resources, nutritional composition and preservation.* **1990**, 29-54.
- Šimko, M. P. B. EPR spectroscopy: A tool to characterize gamma-irradiated foods. *J. Food and Nutr. Res.* **2007**, *46*, 75-83.
- Spraul, M.; Schütz, B.; Rinke, P.; Koswig, S.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Mörtter, M.; Fang, F.; Marx, U.; Minoja, A. NMR-Based Multi Parametric Quality Control of Fruit Juices: SGF Profiling. *Nutrients* **2009**, *1*, 148-155.
- Stevens, J.; Weimer, B.; Slupsky, C. Statistical methods in metabolomics. *Metabolomics in Food and Nutrition* **2013**, 44.
- Sumner, L. W.; Lei, Z.; Nikolau, B. J.; Saito, K. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 212-229.
- Syggelou, A.; Iacovidou, N.; Atzori, L.; Xanthos, T.; Fanos, V. Metabolomics in the developing human being. *Pediatr. Clin. North Am.* **2012**, *59*, 1039-1058.
- Tappi, S.; Berardinelli, A.; Ragni, L.; Dalla Rosa, M.; Guarnieri, A.; Rocculi, P. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innov. Food Sci. Emerg.* **2014**, *21*, 114-122.
- Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 826-828.
- Tiziani, S.; Schwartz, S. J.; Vodovotz, Y. Profiling of carotenoids in tomato juice by one- and two-dimensional NMR. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6094-6100.
- Trimigno, A.; Marincola, F. C.; Dellarosa, N.; Picone, G.; Laghi, L. Definition of food quality by NMR-based foodomics. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *4*, 99-104.
- Toldrá, F.; Aristoy, M.; Flores, M. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 181-185.
- Uarrota, V. G.; Moresco, R.; Coelho, B.; da Costa Nunes, E.; Peruch, L. A. M.; de Oliveira Neubert, E.; Rocha, M.; Maraschin, M. Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. *Food Chem.* **2014**, *161*, 67-78.
- Unterberger, E. B.; Eichner, J.; Wrzodek, C.; Lempiäinen, H.; Luisier, R.; Terranova, R.; Metzger, U.; Plummer, S.; Knorpp, T.; Braeuning, A. Ha-ras and β -catenin oncoproteins orchestrate metabolic programs in mouse liver tumors. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 1574-1585.
- Valentini, M.; Ritota, M.; Cafiero, C.; Cozzolino, S.; Leita, L.; Sequi, P. The HRMAS-NMR tool in foodstuff characterisation. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 121-125.

- van den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **2006**, *7*, 142.
- Vigli, G.; Philippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. Classification of edible oils by employing ^{31}P and ^1H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5715-5722.
- Voda, A.; Homan, N.; Witek, M.; Duijster, A.; van Dalen, G.; van der Sman, R.; Nijssse, J.; van Vliet, L.; Van As, H.; van Duynhoven, J. The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 687-693.
- Voehler, M. W.; Collier, G.; Young, J. K.; Stone, M. P.; Germann, M. W. Performance of cryogenic probes as a function of ionic strength and sample tube geometry. *J. Magn. Reson.* **2006**, *183*, 102-109.
- Weljie, A. M.; Newton, J.; Mercier, P.; Carlson, E.; Slupsky, C. M. Targeted profiling: quantitative analysis of ^1H NMR metabolomics data. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4430-4442.
- Wishart, D. S.; Jewison, T.; Guo, A. C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Arndt, D.; Xia, J.; Liu, P.; Yallou, F.; Bjorn Dahl, T.; Perez-Pineiro, R.; Eisner, R.; Allen, F.; Neveu, V.; Greiner, R.; Scalbert, A. HMDB 3.0 - The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D801-7.
- Wishart, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 482-493.
- Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M. A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D. D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G. E.; Macinnis, G. D.; Weljie, A. M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R.; Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B. D.; Vogel, H. J.; Querengesser, L. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, D521-6.
- Wolfender, J.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K. The potential of LC-NMR in phytochemical analysis. *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 2-22.
- Wu, H.; Southam, A. D.; Hines, A.; Viant, M. R. High-throughput tissue extraction protocol for NMR-and MS-based metabolomics. *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 204-212.
- Wüthrich, K. Nuclear magnetic resonance in protein research. *Experientia* **1974**, *30*, 577-585.
- Ye, M.; Han, J.; Chen, H.; Zheng, J.; Guo, D. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 82-91.

- Zanardi, E.; Caligiani, A.; Palla, L.; Mariani, M.; Ghidini, S.; Di Ciccio, P. A.; Palla, G.; Ianieri, A. Metabolic profiling by ^1H NMR of ground beef irradiated at different irradiation doses. *Meat Sci.* **2015**, *103*, 83-89.
- Zerbe, O.; Jurt, S. Applied NMR Spectroscopy for Chemists and Life Scientist. Wiley, Weinheim 2014.
- Zhang, G.; Hailemariam, D.; Dervishi, E.; Deng, Q.; Goldansaz, S. A.; Dunn, S. M.; Ametaj, B. N. Alterations of Innate Immunity Reactants in Transition Dairy Cows before Clinical Signs of Lameness. *Animals* **2015**, *5*, 717-747.
- Zheng, G.; Stait-Gardner, T.; Kumar, P. A.; Torres, A. M.; Price, W. S. PGSTE-WATERGATE: An STE-based PGSE NMR sequence with excellent solvent suppression. *J. Magn. Reson.* **2008**, *191*, 159-163.

VII. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviaturas, acrónimos y símbolos empleados

En esta Memoria se han empleado acrónimos y abreviaturas recomendados en *Magnetic Resonance in Chemistry* así como otros de uso frecuente en terminología química.

α	<i>Pulse Angle</i>
ACS	<i>American Chemical Society</i>
ADC	<i>Apparent diffusion coefficient</i> - Coeficientes de difusión aparente
ADN	Ácido dexosirribonucleico
ADP	Adenosina Difosfato
Ala	Alanina
AMP	Adenosina Monofosfato
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
Arg	Arginina
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> - Adenosín Trifosfato
au	Unidades Arbitrarias
B_0	Intensidad del campo magnético aplicado
CG	Cromatografía de Gases
CL	Cromatografía de Líquidos
COSY	<i>CORrelated SpectroscopY</i>
CP	<i>Cross Polarization</i> – Polarización Cruzada
CPMG	<i>Carr Purcell Meiboon Gill</i>
Cr	Creatina
CRAMPS	<i>Combined Rotation and Multiple Pulse Spectroscopy</i>
CSA	<i>Chemical shift anisotropy</i> - Anisotropía de desplazamiento químico
δ	Desplazamiento químico
D ₂ O	Agua Deuterada
DA	Grado de acetilación
DD	Grado de desacetilación
DHA	Ácido Docosahexanoico
DMA	Dimetilamina
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido- d_6
DOP	Denominación de Origen Protegida
DOSY	<i>Diffusion Ordered SpectroscopY</i>
DP	Densidad protónica
DSS	Ácido 3,3 dimetil-2,2-silapentano-5-sulfónico
EC	Electroforesis Capilar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de Masas

EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FAC	<i>Fatty Acid Composition</i> - Composición de Ácidos Grasos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>
γ	Relación giromagnética del núcleo
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GC	<i>Gas chromatography</i>
GHz	Gigahercio
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMDS	Hexametildisilano
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HRMAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
Hx	Hipoxantina
I	Número cuántico de espín del núcleo
IGP	Indicación Geográfica Protegida
Ile	Isoleucina
IMP	Inosina Monofosfato
Ino	Inosina
IR	Infrarrojo
IRM	Imagen de Resonancia Magnética
J	Constante de acoplamiento
kGy	Kilogray
KNN	Análisis por Vecinos Cercanos
LB	<i>Line broadening</i>
LDA	Análisis Lineal Discriminante
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m	Momento Magnético
MAS	<i>Magic Angle Spinning</i>
Met	Metionina
MHz	Megahercio
m_i	Número cuántico magnético

MMA	Monometilamina
M_0	Magnetización longitudinal
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
ν_0	Frecuencia de Larmor
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> - Efecto Nuclear Overhauser
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NS	Número de <i>Scans</i>
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
OPLS	<i>Orthogonal PLS</i> - Mínimos Cuadrados Parciales Ortogonales
OTMA	Óxido de Trimetilamina
PC	<i>Principal Component</i> - Componente Principal
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> - Análisis de Componentes Principales
Pcho/GPCho	Fosfocolina – Glicerofosfocolina
Phe	Fenilalanina
PLS	<i>Partial Least Squares</i> - Mínimos Cuadrados Parciales
PLSDA	<i>PLS Discriminant Analysis</i> – Análisis Discriminante por PLS
ppm	Partes Por Millón
REE	Resonancia de Espín Electrónico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN 1D	Resonancia Magnética Nuclear Monodimensional
RMN 2D	Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional
ROI	<i>Region of interest</i> - Región de Interés
RTE	<i>Ready to eat</i> - Listo para el consumo
S/R	Relación Señal - Ruido
Ser	Serina
SNIF-NMR	<i>Site-Specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – Extracción en Fase Sólida
SW	<i>Spectral Width</i> – Anchura Espectral
T	Tesla
T_1	Tiempo de relajación longitudinal
t_1	Tiempo de evolución
T_2	Tiempo de relajación transversal
t_2	Tiempo de detección
T_{2a}	Relajación rápida
T_{2b}	Relajación lenta
TD	<i>Time Domain</i>
TE	Tiempo de eco
TF	<i>Fourier transform</i> - Transformada de Fourier

Thr	Treonina
TMA	Trimetilamina
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total COrelated SpectroscopY</i>
TR	Tiempo de repetición
Trp	Triptófano
TSP	3-(trimetilsilil)propionato-2,2'-3,3'-sódico- d_4
UF-NMR	<i>Ultra Fast NMR</i> / RMN Ultrarrápida
UHPLC	<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
Val	Valina
WET	<i>Water suppression Enhanced through T_1 effects</i>